

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

Lakázové amperometrické biosenzory založené na  
elektrochemicky deponovaných polymerech  
s volnu formylovou skupinou

Diplomová práce

**Autor práce:** Bc. Jasmína Minasjanová

**Vedoucí práce:** Ing. Milan Sýs, Ph.D.

2023

Univerzity of Pardubice

Faculty chemical-technology  
Department of analytical chemistry

Laccase amperometric biosensors based on  
electrochemically deposited polymers with the free  
formyl group

Thesis

**Author:** Bc. Jasmína Minasjanová

**Supervisor:** Ing. Milan Sýs, Ph.D.

2023

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jasmína Minasjanová**  
Osobní číslo: **C21432**  
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Lakázové amperometrické biosenzory založené na elektrochemicky deponovaných polymerech s volnou formylovou skupinou**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Z odborných publikací zpracujte literární rešerši zaměřenou na přípravu amperometrických lakázových biosenzorů, které využívají elektrochemicky deponované polymery s volnou formylovou skupinou.
2. Pomocí elektronové mikroskopie a infračervené spektroskopie charakterizujte připravené polymerní nosiče. Dále popište elektrochemické chování vybraných neurotransmiterů na komerčních tištěných elektrodách a na jejich modifikacích, tzv. amperometrických transduktorech.
3. Proveďte úvodní analytickou charakterizaci, především příslušná kalibrační měření, s vámi připravenými lakázovými (popřípadě i tyrozinázové) biosenzory a porovnejte tak jejich funkčnost a analytickou výkonnost.
4. Získané výsledky a pozorování kriticky diskutujte a zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Ivan Švancara, Dr.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 5. 2023

Bc. Jasmína Minasjanová

## *Poděkování*

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Ing. Milanovi Sýsovi, Ph.D., za trpělivost, ochotu a odborné vedení během celé diplomové práce a prof. Ing. Ivanu Švancarovi, Dr., konzultantovi za zájem a podnětné připomínky při zpracování závěrečné verze textu. Dále můj díky patří Ing. Tomáši Mikyskovi, Ph.D., za pořízení SEM snímku a panu doc. Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D. za provedení charakterizace polymerů na infračerveném spektrometru. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za ochotu a pomoc při imobilizaci enzymu.

## **NÁZEV**

Lakázové amperometrické biosenzory založené na elektrochemicky deponovaných polymerech s volnou formylovou skupinou

## **ANOTACE**

Diplomová práce je zaměřena na imobilizaci enzymu lakázy prostřednictvím tvorby Schiffových bází na elektrochemicky deponované vodivé polymery, obsahující karbonylovou funkční skupinu. Vanilin, 4-hydroxybenzaldehyd a *trans*-cinnamaldehyd byly záměrně vybrány jako možné monomery k elektropolymeraci, jež se prováděla cyklickou voltametrií o padesáti cyklech. Výsledky získané průtočnou injekční analýzou modelových roztoků vybraných neurotransmiterů naznačují, že takto připravené biosenzory opravdu mají vysokou mechanickou stabilitu, a tudíž by se mohly uplatnit při vývoji analytických zařízení pro klinickou analýzu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Lakáza; biosenzory; amperometrie; vodivé polymery; kovalentní imobilizace.

## **TITLE**

Laccase amperometric biosensors based on electrochemically deposited polymers with the free formyl group

## **ANNOTATION**

The diploma thesis is focused on the immobilization of the laccase enzyme through the formation of Schiff bases on electrochemically deposited conductive polymers that are functionalized by a carbonyl group. Vanillin, 4-hydroxybenzaldehyde and *trans*-cinnamaldehyde had been intentionally selected as possible monomers for electropolymerization, which was performed using cyclic voltammetry with fifty cycles. The results obtained by flow injection analysis with model solutions of selected neurotransmitters have indicated that the biosensors prepared in this way really have a high mechanical stability, and could therefore be used as a part of analytical devices for clinical analysis.

## **KEYWORDS**

Laccase; biosensors; amperometry; conductive polymers; covalent immobilisation.

# OBSAH

Úvod.....	14
TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1. Lakáza .....	15
1.1 Zdroje lakázy .....	16
1.1.1. Příprava lakázy z hub .....	18
1.1.1.1. Vliv uhlíku a dusíku.....	18
1.1.1.2. Vliv teploty .....	18
1.1.1.3. Vliv pH .....	18
1.1.1.4. Vliv agitátoru .....	19
1.1.1.5. Vliv induktoru.....	19
1.1.1.6. Submerzní fermentace .....	19
1.1.1.7. Fermentace na pevném médiu .....	20
1.1.1.8. Izolace lakázy z hub.....	20
1.2 Katalytická aktivita lakázy .....	21
1.2.1 Mechanismus katalýzy .....	22
1.2.2 Substráty lakáz .....	23
2. Lakázové elektrochemické biosenzory .....	28
2.1. Stabilita a aktivita lakázových biosenzorů .....	30
2.2. Inhibitory jakožto potencionální interferenty .....	31
2.3. Možnosti kovalentní imobilizace lakázy na polymerní nosiče .....	31
2.3.1. Příprava polymerů na vodivé materiály .....	32
2.3.1.1. Polymery s volnou aldehydovou skupinou.....	33
2.3.2. Navázání lakázy přes aminokyselinové zbytky.....	33
3. Lakázové biosenzory v průtokných systémech.....	34
3.1 Průtoková injekční analýza s amperometrickou detekcí .....	35
3.2 Životnost biosenzorů v průtokové analýze.....	36



EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	37
4. Laboratorní postup .....	37
4.1 Chemikálie a reagentie.....	37
4.2 Přístrojové vybavení .....	38
4.3 Příprava pracovních elektrod.....	39
4.3.1 Příprava modifikované uhlíkové pastové elektrody.....	39
4.3.2 Příprava polymerních nosičů na tištěných elektrodách.....	39
4.3.2.1 Imobilizace enzymů na karbonylem funkcionalizované polymery .....	40
4.4 Příprava pracovních roztoků.....	40
4.5 Parametry použitých technik .....	41
5. Výsledky a diskuse .....	42
5.1 Složení pracovního média .....	42
5.2 Elektrochemická polymerace monomerů s karbonylovou skupinou.....	44
5.2.1 Identifikace karbonylových skupin infračervenou spektroskopií .....	46
5.2.2 Charakterizace karbonylem-funkcionovaných polymerů .....	48
5.3 Elektrochemické chování neurotransmiterů na polymerních substrátech.....	49
6. Závěr .....	57
Reference .....	58

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1.</b> Obecný mechanismus elektrooxidace substrátů. ....	15
<b>Obrázek 2.</b> Využití lakázy v průmyslu. ....	16
<b>Obrázek 3.</b> Dřevokazná houba <i>Trametes versicolor</i> (podle [6,7]). ....	17
<b>Obrázek 4.</b> Ponorný bioreaktor pro fermentaci. ....	20
<b>Obrázek 5.</b> Typ vazby atomů mědi s aminokyselinovými zbytky proteinů. ....	22
<b>Obrázek 6.</b> Enzymatická oxidace hydrochinonu, schéma [13]. ....	23
<b>Obrázek 7.</b> Oxidace dopaminu na vniku DHI melaninu [18]. ....	25
<b>Obrázek 8.</b> Mechanismus vysvětlující trimerizaci indolu katalyzovanou lakázou [20]. ....	26
<b>Obrázek 9.</b> Elektrochemická oxidace serotoninu. ....	26
<b>Obrázek 10.</b> Katalytická oxidace adrenalinu a noradrenalinu [23]. ....	27
<b>Obrázek 11.</b> Schémata konfigurací enzymatických biosenzorů. ....	29
<b>Obrázek 12.</b> Schémata průtokového lakázového reaktoru pro injekční analýzu [26]. ....	30
<b>Obrázek 13.</b> Elektropolymerace 4-hydroxybenzaldehydu z acetonitrilu na povrch GCE pomocí opakující se cyklické voltametrie [44]. ....	34
<b>Obrázek 14.</b> Schéma FIA s typickým záznamem pro tři stejná opakování [49]. ....	35
<b>Obrázek 15.</b> Aktivita lakázy na čase v závislosti na způsobu imobilizace [51]. ....	37
<b>Obrázek 16.</b> Průtoková cela se zabudovanou tištěnou uhlíkovou elektrodou [52]. ....	39
<b>Obrázek 17.</b> Cyklické voltamogramy 0,01 mol·l <sup>-1</sup> hydrochinonu obdržené na CPE (celá) a CPE/Lac (přerušovaná čára) v 0,1 mol·l <sup>-1</sup> acetátovém (zelené), fosforečnanovém (modré) a Britton-Robinsonově pufru (červené čáry) při rychlosti skenování 10 mV·s <sup>-1</sup> . ....	43
<b>Obrázek 18.</b> Cyklický voltamogram 500 μmol·l <sup>-1</sup> hydrochinonu obdržen na CPE v 0,1 mol·l <sup>-1</sup> fosforečnanovém pufru o pH 2 (modrá), 3 (černá), 4 (fialová), 5 (zelená) a v 0,1 mol·l <sup>-1</sup> fosfátovém pufru o pH 6 (červená čára) se skenovací rychlostí 10 mV·s <sup>-1</sup> . ....	44
<b>Obrázek 19.</b> Elektrochemická polymerace prostřednictvím cyklické voltametrie (50 cyklů) 2 mg·ml <sup>-1</sup> vanilinu v 0,1 mol·l <sup>-1</sup> PB o pH 7 (a), 2 mg·ml <sup>-1</sup> <i>trans</i> -cinnamaldehydu rozpuštěného ve směsi 0,5 mol·l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 96% ethanolu (3:7) (b), 2 mg·ml <sup>-1</sup> 4-hydroxybenzaldehydu v 0,1 mol·l <sup>-1</sup> PB o pH 7 (c), na SPCE při skenovací rychlosti 200 mV·s <sup>-1</sup> . ....	45
<b>Obrázek 20.</b> FTIR spektra vanilinu a polyvanilinu (a), 4-hydroxybenzaldehydu a poly-4-hydroxybenzaldehydu (b), <i>trans</i> -cinnamaldehydu a poly- <i>trans</i> -cinnamaldehydu (c). Pásky monomeru jsou označeny černou barvou. ....	47

<b>Obrázek 21.</b> SEM snímek čisté SPCE (A), SPCE pokryté pouze polyvanilinem (B), poly- <i>trans</i> -cinnamaldehydem s navázanou tyrosinázou (C), 4-hydroxybenzaldehydem a navázanou tyrosinázou (D). .....	48
<b>Obrázek 22.</b> EDX spektrum při mapování přítomnosti mědi u tyrosinázy navázané na poly-4-hydroxybenzaldehydu. ....	49
<b>Obrázek 23.</b> Cyklické voltamogramy 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu (a), noradrenalinu (b), serotoninu (c), adrenalinu (d), obdržené na SPCE (černé) a na SPCE s polyvanilinem (modré křivky) v 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforečnanovém pufru o pH 5 při rychlosti skenování 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . ....	50
<b>Obrázek 24.</b> Cyklické voltamogramy 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu (a), noradrenalinu (b), serotoninu (c), adrenalinu (d), obdržené na SPCE (černé) a na SPCE s poly- <i>trans</i> -cinnamaldehydem (červené křivky) v 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforečnanovém pufru o pH 5 při rychlosti skenování 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . ....	51
<b>Obrázek 25.</b> Cyklické voltamogramy 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu (a), noradrenalinu (b), serotoninu (c), adrenalinu (d), obdržené na SPCE (černé) a na SPCE s poly-4-hydroxybenzaldehydem (zelené křivky) v 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforečnanovém pufru o pH 5 při rychlosti skenování 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . ....	52
<b>Obrázek 26.</b> Amperogramy z měření pro kalibraci dopaminu (DA) na čisté (nemodifikované) SPCE elektrodě (černá), na SPCE s poly- <i>trans</i> -cinnamaldehydem (červená) a na SPCE s polyvanilinem (modrá). ....	53
<b>Obrázek 27.</b> Amperogramy (sádkové uspořádání) získané na čisté SPCE s tyrosinásou, po 10 injektážích 10 $\mu\text{l}$ 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopaminu (modrá), noradrenalinu (černá) a adrenalinu (červená křivka), do 10 ml 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 7 při konstantním napětí $-0,2\text{ V}$ a rychlosti míchání 400 rpm. ....	54
<b>Obrázek 28.</b> Kalibrační závislost neurotransmiterů pro koncentrace od 10 do 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dopamin (modrá), noradrenalin (černá), adrenalin (červená křivka). ....	55
<b>Obrázek 29.</b> Amperogram kalibračního měření noradrenalinu (10-50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) získaný na SPCE s poly-4-hydroxybenzaldehydem a tyrosinásou. FIA se prováděla v 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátovém pufru o pH 7, s pracovním potenciálem $-0,2\text{ V}$ , injekčním objemem 100 $\mu\text{l}$ a průtokem 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . ....	55

<b>Tabulka 1.</b> Substráty a základní podmínky, přehled (dle [5]). .....	24
<b>Tabulka 2.</b> Původ lakáz a jejich podmínky [5]. .....	24
<b>Tabulka 3.</b> Běžné hladiny neurotransmiterů v tělních tekutinách u zdravých jedinců. ....	25
<b>Tabulka 4.</b> Kinetické parametry enzymatické katalýzy pro vybrané substráty [25]. .....	28
<b>Tabulka 5.</b> Parametry průtokové injekční analýzy vybraných Lac a Tyr biosenzorů. ....	36
<b>Tabulka 6.</b> Výkonost SCPE s imobilizovanou tyrosinásou bez přítomnosti polymerů. ....	56

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABTS	2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzothiazolin-sulfonát]
AcB	acetátový pufr
ATR-FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací se sníženou celkovou odrazivostí
BRB	Britton-Robinsonův pufr
BSA	bovinní sérový albumin
CPE/Lac	uhlíková pastová elektroda modifikovaná lakázou
CYS	cystein
DA	dopamin
DHI	5,6-dihydroxyindol
DMP	2,6-dimethoxyphenol
DTT	dithiothreitol
FIA	průtoková injekční analýza
HBT	1-hydroxybenzotriazol
HIS	histidin
Lac	lakáza
LMS	lakáza-mediatorový systém
MET	methionin
NA	noradrenalin
PB	fosforečnanový pufr
PBSA	stabilizační činidla na bázi proteinů
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SO	silikonový olej
TGA	kyselina thioglykolová
Tyr	tyrosináza
5-HT	5-hydroxytryptamin

## Úvod

Tato diplomová práce pojednává o možnostech použití polymerů s funkčními skupinami na bázi karbonylu, při tvorbě katalyticky aktivních biorekognizačních vrstev, jež vznikají po kovalentním navázání enzymů (lakázy a dodatečně tyrosinázy) prostřednictvím tvorby Schiffových bázi (iminů). Jako vhodné monomery pro elektropolymeraci pomocí cyklické voltametrie byly vybrány vanilin, *trans*-cinnamaldehyd a 4-hydroxybenzaldehyd. Výběr jednotlivých monomerů nebyl náhodný, jelikož při porovnání výsledných absorpčních pásů z infračervené spektrometrie a proudových odezev výsledných amperometrických biosenzorů lze usoudit, zda chybějící hydroxy skupina na benzenovém jádře (*trans*-cinnamaldehydu) nebo methoxy skupina (vanilinu) mohou mít významný vliv na tvorbu polymeru.

Teoretická část je věnována základní charakterizaci enzymu lakázy, možnostem jeho izolace z hub a katalytické aktivitě (oxidaci) katecholaminů a indolů, které představují klinicky významné analyty. Dále tato část diplomové práce popisuje nejmodernější přístupy přípravy lakázových reaktorů pro průtočnou injekční analýzu.

Všeobecně se předpokládá, že kovalentní imobilizace enzymů na elektrochemicky deponované polymery může zaručit vysokou mechanickou stabilitu výsledného biosenzoru, a tudíž i vysokou reprodukovatelnost analýz. Z tohoto důvodu existuje předpoklad, který je popsán v praktické části této diplomové práce, že je možné připravit také polymery obsahující karbonylové skupiny (R-CH=O), které budou vykazovat vysokou elektrochemickou reaktivitu dusíkatým organickým sloučeninám (katecholaminů) pro možný vývoj voltametrických, popřípadě amperometrických senzorů, využívající jejich přímé elektrochemické oxidace.

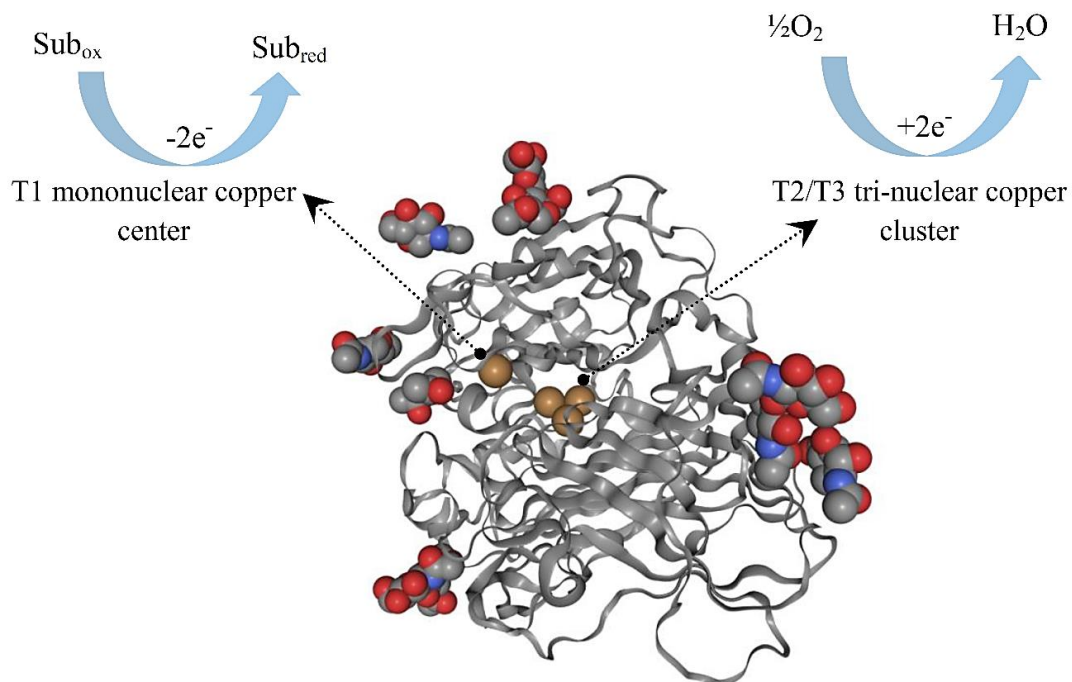
Experimentální část začíná přehledem použitých chemikálií, potřebné instrumentace a navrženého laboratorního postupu. Vzhledem k tomu, že tato diplomová práce nepopisuje vývoj konkrétního biosenzoru, ale spíše způsob, jak by bylo možné reprodukovatelně takovéto zařízení laboratorně připravovat, neobsahuje experimentální část složitou optimalizaci. Připravené polymerní vrstvy byly charakterizovány skenovací elektronovou mikroskopií. Přítomnost karbonylových funkčních skupiny se dokazovala pomocí infračervené spektroskopie. Distribuce kovalentně navázaných molekul enzymu byla mapována energeticky disperzní rentgenovou spektroskopií. Obdržené výsledky získané průtočnou injekční analýzou modelových roztoků vybraných neurotransmitterů naznačují, že takto připravené biosenzory opravdu mají vysokou mechanickou stabilitu, a tudíž by mohly uplatnit při vývoji analytických zařízení v klinické analýze.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. Lakáza

Lakázy (*Laccase*; Lac) patří mezi nejstarší a nejvíce prozkoumané enzymatické systémy. Z chemického hlediska lze tyto enzymy považovat za glykoproteiny, jelikož obsahují 15–30 % sacharidů. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje od 60 do 90 kDa. Lac mají schopnost katalyzovat oxidaci široké škály substrátů, a to jak fenolických, tak nefenolických (substituované aniliny), spojenou s redukcí molekulárního kyslíku na vodu s jedním elektronovým oxidačním mechanismem [1,2].

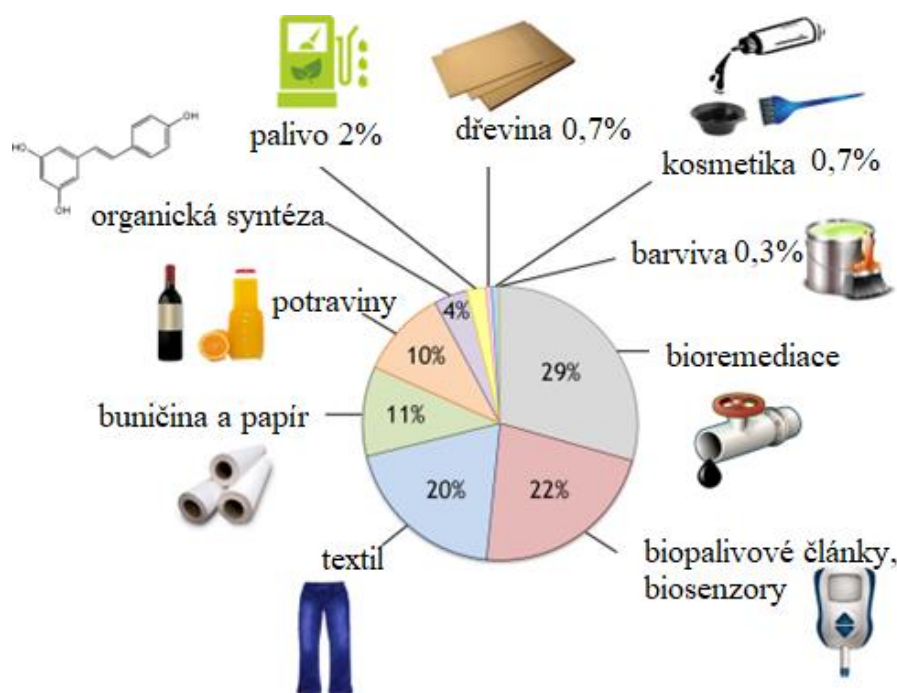
Na základě výše uvedených skutečností se Lac řadí mezi kyslíkové oxidoreduktázy, které se nacházejí ve vyšších rostlinách, bezobratlých a mikroorganismech. Lac jsou povětšinou tvořeny ze tří těsně uspořádaných domén podobných kupredoxinu, označených jako T1, T2 a T3 [1]. Aktivní centrum obsahuje čtyři atomy mědi ve třech skupinách, dle svého výskytu v molekulové struktuře, jenž jsou koordinované deseti dusíky histidinových (His) zbytků a dvěma síry od zbytků metioninu (Met) a cysteinu (Cys). Místa T1 a T2 slouží jako primární akceptory elektronů, zatímco na T3 dochází k redukcí intramolekulárním přenosem dvou elektronů z T1 a T2 [3]. Strukturu Lac popisuje Obr. 1.



**Obrázek 1.** Obecný mechanismus elektrooxidace substrátů.

Lac představuje často používaný enzym v různých oblastech průmyslu, jmenovitě textilním, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Často se také používá při degradaci

aromatických polutantů způsobujících environmentální problémy – k biodegradaci environmentálních fenolických polutantů a odstraňování endokrinních disruptorů. Tyto enzymy se také používají pro delignifikaci buničiny, degradaci pesticidů nebo insekticidů, organickou syntézu, detoxikaci odpadu, transformaci textilních barviv a v potravinářské technologii. Obr. 2 popisuje procentuální využití v průmyslu.



Obrázek 2. Využití lakázy v průmyslu.

Lac nachází své široké uplatnění i v nanobiotechnologii, a to díky jejich schopnosti katalyzovat reakce klinicky významných substrátů bez nutnosti přítomnosti dalšího kofaktoru. Lac se skladuje za teplot 2-8 °C. Aktivita v závislosti na jednotlivých parametrech je rozebrána níže v kapitolách.

### 1.1 Zdroje lakázy

Lac produkují vyšší rostliny, bakterie, houby a hmyz. V rostlinách se nacházejí v zelí, tuřínu, bramborách, hruškách, jablkách a v dalších produktech [1]. Lac se u některých bakterií vyskytuje jako jsou *S.lavendulae*, *S.cyaneus* a *Marinomonas mediterranea*. U hub se ovšem Lac objevují více než u vyšších rostlin. Enzymy se vylučují během sekundárního metabolismu v extracelulárním médiu hub. Za zdroj Lac se může považovat například půda nebo může být izolována z některých sladkovodních druhů Ascomycetes, které daný enzym produkují. Bývají izolovány i z hub Deuteromycet a Basidiomycet, ke kterým se řadí více než 60 kmenů hub.



Mezi další producenty lze zařadit *Gaeumannomyces graminis*, *Magnaporthe grisea*, *Ophiostoma novoulmi*, *Marginella*, *Melanocarpus albomyces*, *Monocillium indicum*, *Neurospora crassa* a *Podospora anserina*. Například *Botryosphaeria* produkuje enzym oxidující dimethoxyfenol, řazena mezi Ascomycety, které se podílí na rozpadu rostlinné biomasy. *Cryptococcus neoformans*, kvasinka Basidiomycet, která produkuje Lac a oxiduje fenoly a aminofenoly, ale není schopna oxidovat tyrosin. Pouze multiměď oxidáza *Saccharomyces cerevisiae* vázaná na plazmatickou membránu vykazuje shodu s fungální Lac.

Basidiomycety a saprotrofní houby patří mezi nejznámějšími druhy, které produkuje značné množství Lac v proměnlivém množství. Schopnost produkce Lac u hub s hnědou hnilobou není ovšem známa, jelikož žádnou se nepodařilo vyčistit [3]. Houby Basidiomycety s bílou hnilobou účinně degradují lignin ve srovnání s Ascomycety a Deuteromycety, které oxidují fenolické sloučeniny za vzniku fenoxi radikálů a chininů [1]. Lac se hojně vyskytují právě ve zmíněných houbách s bílou hnilobou, které zatím patří mezi jediné organismy, které rozkládají celé složky dřeva (tj. celulózu, hemicelulózu a lignin). Basidiomycety (mezi které patří *Phanerochaete chrysosporium*, *Theiophora terrestris* a *Lenzites betulina*, nyní *Trametes betulina*) a houby s bílou hnilobou (jakožto *Phlebia radiate*, *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor*, Obr. 3) se nejvíce studují právě kvůli produkce Lac. Mezi další prostudované houby produkující Lac z rodu *Trametes* se v literatuře uvádí *Trametes pubescens*, *Trametes hirsuta* a *Trametes gallica* [5].

V poslední řadě lze za zdroj tohoto enzymu považovat mnoho druhů z rodu *Trichoderma* (T.), jako je *T. atroviride*, *T. harzianum* a *T. longibrachiatum*. Lac z *Monocillium indicum*, původem z Ascomycet, která jako jediná z lakáz vykazuje peroxidázovou aktivitu. *Pycnoporus cinnabarinus* produkuje ligninolytický enzym, zatímco *Pycnoporus sanguineus* produkuje Lac jako fenoloxidázu. U rostlin hraje Lac roli v lignifikacích, zatímco u hub se podílí na delignifikaci, sporulaci, produkci pigmentu, tvorbě plodnic a patogenezi rostlin [2].



**Obrázek 3.** Dřevokazná houba *Trametes versicolor* (podle [6,7]).

### **1.1.1. Příprava lakázy z hub**

Izolace Lac se provádí v několika krocích, kdy nejpodstatnější část je kultivace vybraného organismu. K vytvoření enzymu z houby s bílou hnilobou se používá kultivace za specifických podmínek. Kultivace může být buďto submerzní nebo může probíhat na pevné fázi. Produkci enzymu ovlivňuje škála faktorů, jakožto přítomnost dusíku a uhlíku, teplota, pH či induktor [7], jež jsou níže detailněji popsány.

#### **1.1.1.1. Vliv uhlíku a dusíku**

Každý živý organismus, aby optimálně rostl, potřebuje zdroje stavebních materiálů. Houby se většinou pěstují v definovaném médiu obsahující 0,1 % kvasinkového extraktu a 1 % uhlíku a také dusíku. Glukóza, manóza, maltóza, fruktóza a laktóza jsou běžně používanými zdroji uhlíku. Přebytek glukózy a sacharózy snižuje produkci Lac tím, že brání iniciaci. Tento problém produkce enzymu lze potlačit použitím polymerních substrátů, například celulozou. Kvasinkový extrakt, pepton, močovina,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a  $\text{NaNO}_3$  jsou běžně používanými zdroji dusíku. Produkce Lac se započne vyčerpáním dusíku. Pozornost musí směřovat na to, že ne všechny zdroje dusíku ovlivňují aktivitu enzymu. Některé studie dokazují, že použitím nízkého poměru uhlíku a dusíku došlo ke zvýšení aktivity Lac, zatímco jiné prokazují, že ke zvýšení aktivity došlo při vyšším poměru uhlíku a dusíku [2].

#### **1.1.1.2. Vliv teploty**

Optimální teplota se u jednotlivých kmenů značně různí. Zjistilo se, že 25 °C je optimální teplota pro kultivaci za přítomnosti světla, ale v případě kultivace za tmy se za optimální teplotu považuje 30 °C. Optimální teplotní rozsah pro kultivaci hub tedy činí 25 °C až 30 °C. V jedné studii zjistili, že předinkubace některých hub při 40 a 50 °C značně zvýšila aktivitu izolované Lac [3].

#### **1.1.1.3. Vliv pH**

Optimální hodnota pH se odvíjí od použitého kultivačního média (substrátu), protože různé substráty způsobují různé reakce. *Trametes (T.) versicolor* vykazovala vysokou enzymatickou aktivitu v širokém rozmezí pH a teplot, ale optimální aktivita byla zjištěna při pH 3 a teplotě 50 °C. Optimální pH pro houbové Lac je kyselé v rozmezí pH 3-5 [3]. Za laboratorních podmínek (při teplotě 25 °C) *T. versicolor* vykazuje velkou stabilitu při pH mezi 6 a 7 a střední stabilitu při pH 5 a pH 8 [8].

#### **1.1.1.4. Vliv agitátoru**

Agitovanost je dalším faktorem, který ovlivňuje aktivitu izolované Lac. V literatuře je možné se dozvědět, že při pěstování houby v míchaném reaktoru dochází k poškození mycelia a tím dojde ke snížení produkce. I když existují i studie na aktivitu Lac z *T. versicolor*, které toto tvrzení vyvrací [3].

#### **1.1.1.5. Vliv induktoru**

Jak již bylo dříve zmíněno, množství nakultivované houby, ale i katalytická aktivita přítomné Lac je vysoce závislá na kultivaci houby. Během sekundární metabolické fáze koncentrace dusíku spouští a aktivuje ligninolytické systémy. Lac jsou obecně produkovány v nízkých koncentracích. Ovlivnit podmínky můžeme cizorodou (xenobiotickou) sloučeninou, díky které získáme vyšší koncentrace. Je známo, že přidáním aromatických sloučenin, například pomocí 2,5-xylidinu, ligninu a veratrylalkoholu, zvýšíme a vyvoláme aktivitu Lac.

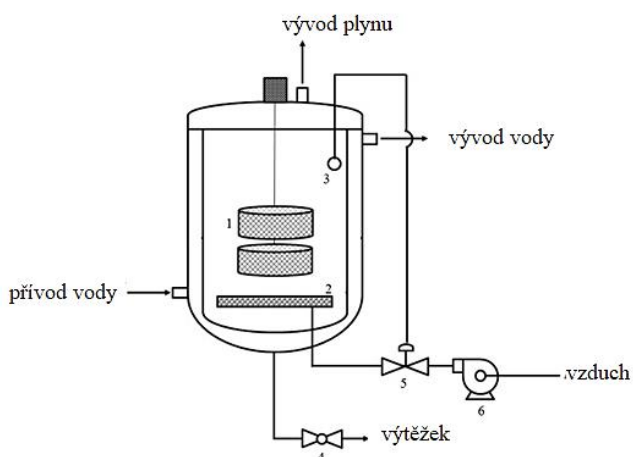
Například přidavek 2,5-xylidinu po 24 hodinách kultivace poskytl nejvyšší indukci aktivity, přičemž devítinásobně zvýšil katalytickou aktivitu. Při vyšších koncentracích 2,5-xylidin vykazoval negativní vliv – redukční účinek v důsledku své toxicity. Oblast promotoru kódující Lac obsahuje různá rozpoznávací místa, která jsou specifická pro xenobiotika, která se vážou na rozpoznávací místa a indukují tak produkci enzymu [2,3].

#### **1.1.1.6. Submerzní fermentace**

Ke kultivaci se může volit mezi dvěma druhy fermentace, a to na základě voleného média, jmenovitě submerzní fermentace či fermentace na pevné fázi. Při submerzní fermentaci se využívá kapalné živné médium s vysokým obsahem kyslíku [3]. Průmyslová výroba Lac se provádí hlavně ponořenou (submerzní) fermentací, která zahrnuje růst mikroorganismů v kapalném prostředí s vysokou koncentrací kyslíku a bohatým obsahem živin. Růstové vzorce v ponořených kulturách obvykle vedou k růstu mycelia, který má vliv na rychlost metabolismu, přenos hmoty a sekreci produktu. Kromě toho oběžná kola omezují přenos hmoty a kyslíku [6].

### 1.1.1.7. Fermentace na pevném médiu

Tento druh fermentace je definován jako jakýkoli fermentační proces probíhající v nepřítomnosti nebo v minimálním množství volné kapaliny s použitím inertního substrátu nebo přírodního substrátu jako pevného nosiče [1], který je vhodný pro produkci enzymů pomocí přírodních substrátů, jako jsou zemědělské zbytky, protože napodobují podmínky, za kterých houby přirozeně rostou [3]. To jim může umožnit produkovat určité enzymy a metabolity, které by obvykle nebyly produkovány nebo by byly produkovány pouze s velmi nízkým výtěžkem [1]. Lignin, celulóza a hemicelulózy obsahují velké množství cukru a podporují růst hub ve fermentoru a činí proces ekonomičtější. Nevýhodou je konstrukce bioreaktoru – ten má vliv na přenos tepla a hmoty. Jednoduché schéma takového bioreaktoru (1; koš z drátěného pletiva, 2; difuzor, 3; kyslíkový senzor, 4,5; ventily a 6; čerpadlo) je znázorněno na Obr. 4.



**Obrázek 4.** Ponorný bioreaktor pro fermentaci.

Nejrůznější konfigurace bioreaktoru byly navrženy za účelem vysoké produkce Lac, a to imerzní konfigurace, expandované lože, inertní (nylon) a neinertní nosič (ječné otruby). Větší vliv na produkci Lac při fermentaci na pevné fázi i submerzní fermentaci má využití rýžových otrub než jiných substrátů. Indukční schopnost rýžových otrub se zakládá na fenolických sloučeninách, jako je kyselina ferulová a kyselina vanilová, které indukují produkci Lac. Mnoho zemědělských odpadů, jako jsou semena hroznů, stonky hroznů, otruby ječmene, odpadní voda z melasy a pšeničné otruby se také využívají jako výrobní substrát [3,10].

### 1.1.1.8. Izolace lakázy z hub

Podstatou výtěžnosti enzymu je nutnost dodržet předepsané optimální podmínky a postupovat dle určitých postupů – kultivace, purifikace a čištění supernatantu obsahující výsledný extrakt. Ve studii, která se zabývala kinetickou charakterizací purifikace lakázy

vyrobené z *T. versicolor*, bylo navrženo kultivování houby v Kirkově bazálním solném médiu, přičemž sterilace média proběhla při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na pokojovou teplotu se spory vložily do baňky se živnou půdou. Inkubace probíhala po dobu 5 dnů při 30 °C v orbitální třepačce při 120 otáčkách za minutu, aby se získalo homogenní sporové inokulum obsahující 106-108 spor·ml<sup>-1</sup>.

Obecně platí, že naočkované baňky sporovým inokulem se inkubují při 30 °C po dobu pěti dnů. Poté se enzymy z namnožených hub extrahují přidáním destilované vody a následným třepáním při 120 otáčkách za minutu po dobu 30 min. V posledním kroku se musí provést zfiltrování obsahu přes filtrační papír a filtráty se nechají následně odseparovat pomocí centrifugace při 3000 ot·min<sup>-1</sup> po dobu 10 min. Získaný extrakt se musí vždy přechistit. K tomuto účelu slouží, buď srážecí metody či separační. Síran amonný je běžně používán k čištění enzymů již řadu let, využívají se i iontoměniče případně chromatografické metody.

Zmíněnou centrifugací a přidávkem síranu amonného se shromáždí sraženina, kdy se pelety vysrážených proteinů odstraní. Další přídavek síranu amonného, do supernatantu, aby se dosáhlo 90% nasycení, se pelety rozpustí v minimálním objemu 50 mol·l<sup>-1</sup> malonátového pufru při pH 4, přičemž se dialýzou odstraní přebytečný síran. Gelová filtrační chromatografie představuje purifikační (čisticí) techniku, založenou na různých elučních vlastnostech enzymu a balastních látek. Jako eluční činidlo často slouží 0,01 mol·l<sup>-1</sup> fosfátový pufr s 0,15 mol·l<sup>-1</sup> NaCl při průtoku 0,5 ml·min<sup>-1</sup> [3].

## 1.2 Katalytická aktivita lakázy

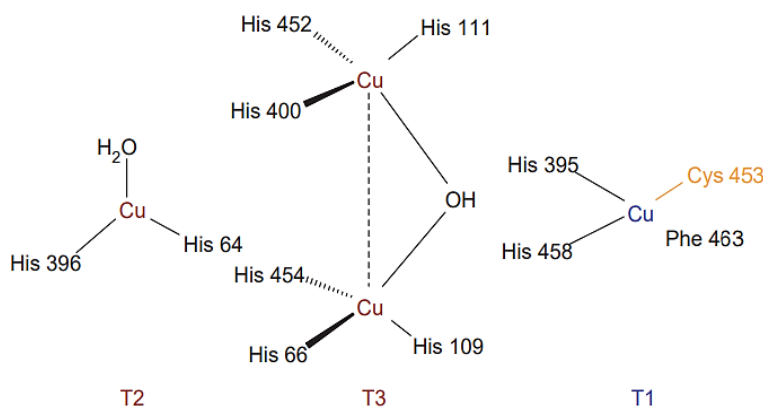
Lakázové enzymy využívají molekulární kyslík k oxidaci různých aromatických a nearomatických sloučenin za vzniku radikálu. Lac mohou katalyzovat přeměnu *o*- a *p*-difenolů, aminofenolů, methoxy-substituovaných fenolů, benzenthioolů, polyfenolů, polyaminů, hydroxyindolů, některých aryldiaminů a značnou řadu dalších sloučenin. Funkce Lac je také mnohdy inhibována různými činidly. Mezi významné inhibitory lze zařadit sloučeniny jako jsou azidy, halogenidy, kyanidy, thiokyanidy, fluoridy a hydroxidy. K inhibici dochází tak, že se molekuly navážou na měď typu 2 a typu 3, v ten moment dojde k přerušení vnitřního přenosu elektronů a dojde tak k potlačení aktivity enzymu. Mezi další inhibitory můžeme řadit také kovové ionty např. Hg<sup>2+</sup>, mastné kyseliny, sulfhydrylové činidla, hydroxyglycin, kyselinu kojovou či kationtové kvartérní amoniové detergenty, které mohou způsobovat modifikaci aminokyselinových zbytků, konformační změny nebo chelataci mědi. Konformační změny jsou vysoce závislé na oxidačním stavu mědi a pH prostředí [1].

Aktivita se běžně stanovuje pomocí substrátu ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzothiazolin-sulfonát]). Jedna jednotka aktivity je běžně definována jako množství enzymu, které pomohlo zoxidovat 1  $\mu\text{mol}$  ABTS za minutu. Aktivita optimální úrovně při 20 °C ( $9,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) odpovídá  $0,35 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$  při 30 °C.

### 1.2.1 Mechanismus katalýzy

V aktivním centru lakáz se nacházejí blízko u sebe tři atomy mědi typu T2 a T3. Z toho tři ligandy slučují atomy mědi typu T2 se dvěma zbytky histidinu a molekulou vody. Mezi atomy mědi typu T3 se nachází hydroxidový můstek a na obou atomech jsou navázány tři histidinové zbytky, jež koordinují atomy mědi. Oxidace substrátu probíhá v centru T1 a poté jsou produkované elektrony přenášeny přes cystein koordinující T1 do dvou histidinových zbytků v trinukleárních místech T3. Koordinace jednotlivých typů měděných atomů je znázorněna níže na Obr. 5.

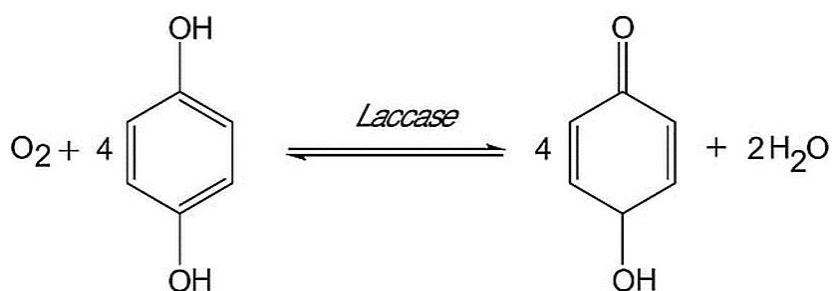
Paramagnetická měď v T1 je zodpovědná za charakteristickou modrou barvu proteinu v redukovaném klidovém stavu, kde dochází k oxidaci substrátu, tato vlastnost je výhodná při spektrálním stanovení. Po přenosu elektronu dochází na T3 k úbytku molekuly kyslíku. Tři jaderné místo s atomy typu T2 a typu T3 představuje reakční centrum, kde dochází k dikyslíkovým a multielektronovým redukčním procesům.



**Obrázek 5.** Typ vazby atomů mědi s aminokyselinovými zbytky proteinů.

Obecně lze konstatovat, že Lac katalyzuje oxidaci substrátů zachycením elektronu a produkcí volných radikálů, které mohou projít různými reakcemi. Elektrony přenesené do místa T3 přes můstek tvořený cysteinem a histidinem se používají k redukci kyslíku až na vodu [5,12]. Použitím molekulárního kyslíku jako akceptoru elektronů může Lac účinně katalyzovat oxidaci substrátů a současně vytvářet fenoxi radikály, které se spontánně přeskupují, aby otevřely aromatické kruhy nebo podpořily jejich polymeraci. Vzhledem nízkým redox potenciálům fenolických látek (0,5–1,0 V), lze tyto sloučeniny zařadit mezi substráty.

Kromě toho může být rozsah lakázových substrátů rozšířen na sloučeniny s vyšším redox potenciálem, než je samotná Lac, a to především pomocí difuzních elektronových nosičů, známých jako lakázové redoxní mediátory [19]. Příkladem těchto mediátorů jsou 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonová kyselina; ABTS) nebo 1-hydroxybenzotriazol (HBT), které tvoří lakáza-mediatorový systém (LMS). Obr. 6 demonstruje jednoduchou oxidaci hydrochinonu katalyzovanou přítomnou Lac.



**Obrázek 6.** Enzymatická oxidace hydrochinonu, schéma [13].

### 1.2.2 Substráty lakáz

Substráty, jež jsou Lac katalyticky oxidovány jsou zmíněny v Tab. 1 spolu se specifickými podmínkami. V Tab. 2 jsou jednotlivé Lac spolu s příslušnými substráty, induktory a inhibitory. Nejčastěji používané prostředí představují acetátový, citrátový a fosfátový pufr. Mezi nejběžnější substráty se řadí ABTS a DMP.

Mezi klinicky významné substráty lze zařadit i některé katecholaminy (označované též jako neurotransmitery), jež se řadí mezi stresové hormony (neurotransmitery) vylučované dřením nadledvin (adrenalin a noradrenalin) nebo hormony „pocitu štěstí“ vylučované epifýzou (serotonin) či hypotalamu (dopamin) v centrálním nervovém systému a trávicím systému (serotonin). Jelikož se jedná o deriváty katecholu či indolu (serotonin), podléhají katalytické oxidaci a následné polymeraci za vzniku analogů melaninu. Normální hladiny jednotlivých neurotransmiterů jsou uvedeny v Tab. 3.

#### 1.2.2.1. Katalytická oxidace neurotransmiterů

Dopamin (DA) řídí v mozku různé funkce včetně pohybové aktivity, emocí, pozitivního vnímání, příjmu potravy a endokrinní regulace. Tudiž monitorování jeho hladin v tělních tekutinách by mohlo pomoci k diagnostice některých onemocnění.

DA je katalyticky oxidován na velice nestabilní dopamin-*o*-chinon, jež okamžitě podléhá následné reakci (zacyklení) za tvorby 5,6-dihydroxyindolinu díky přítomnosti primární amino skupiny na bočním řetězci.

**Tabulka 1.** Substráty a základní podmínky, přehled (dle [5]).

Substrát	$\varepsilon^{[a]}$ ( $\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Optimální prostředí
ABTS <sup>[b]</sup>	36000	0,01 mol·l <sup>-1</sup> acetátový pufr (pH 5.0) při 25 °C
ABTS	34220	0,1 mol·l <sup>-1</sup> vinný pufr (pH 4.5) při 25 °C
ABTS	29300	0,05 mol·l <sup>-1</sup> sukcinát sodný (pH 4.5) při 30 °C
ABTS	26000	0,05 mol·l <sup>-1</sup> vřinan sodný (pH 4.5) při 25 °C
Anil-G <sup>[c]</sup>	28770	0,1 mol·l <sup>-1</sup> fosfát sodný (pH 7.5) při 25 °C
Katechol	26000	0,1 mol·l <sup>-1</sup> acetát sodný (pH 5) při 25 °C
DMP <sup>[d]</sup>	49600	0,05 mol·l <sup>-1</sup> malonát sodný (pH 4.5) při 37 °C
DMP	14800	0,01 mol·l <sup>-1</sup> citrát sodný (pH 5) při 50 °C
DMPDA <sup>[e]</sup>	ND <sup>[i]</sup>	0,02 mol·l <sup>-1</sup> fosfát sodný (pH 7.5) při 25 °C
L-DOPA <sup>[f]</sup>	ND <sup>[i]</sup>	0,1 mol·l <sup>-1</sup> citrát-fosfát sodný (pH 5) při 40 °C
HMA <sup>[g]</sup>	ND <sup>[i]</sup>	0,1 mol·l <sup>-1</sup> acetát sodný (pH 4.5) při 25 °C
<i>p</i> -PD <sup>[h]</sup>	ND <sup>[i]</sup>	0,1 mol·l <sup>-1</sup> citrát-fosfát sodný (pH 5) při 40 °C
<i>o</i> -Tolidine	ND <sup>[i]</sup>	0,2 mol·l <sup>-1</sup> acetát sodný (pH 4.5) při 25 °C

Poznámky: <sup>[a]</sup> absorpční koeficient, <sup>[b]</sup> 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), <sup>[c]</sup> 2-methoxy-4-[(4-phenyl)azo]phenol, <sup>[d]</sup> 2,6-dimethoxyphenol, <sup>[e]</sup> *N,N*-dimethyl-*para*-phenylenediamine <sup>[f]</sup> L-3,4-dihydroxyphenylalanine, <sup>[g]</sup> 4-hydroxymandelic acid, <sup>[h]</sup> *para*-phenylenediamine, <sup>[i]</sup> nespecifikováno.

**Tabulka 2.** Původ lakáz a jejich podmínky [5].

Původ lakázy	$K_m$ [ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Substrát	Induktor	Inhibitor
<i>Populus canadensis</i>	0,03	ABTS	—	NaCN, SDS
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	0,33	guaiacol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	L-cystein
<i>Rigidoporus lignosus</i> B	0,08	ABTS	PHBA	NaCN
<i>Rigidoporus lignosus</i> S	0,049	ABTS	PHBA	NaCN
<i>Trametes versicolor</i>	0,038	ABTS	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	EDTA, MnCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub>
<i>Trametes gallica</i> Lac 1	0,012	ABTS	2,5-xyloidin	NaN <sub>3</sub>
<i>Trametes gallica</i> Lak II	0,009	ABTS	2,5-xyloidin	NaN <sub>3</sub>
<i>Trametes hirsuta</i>	0,07	ABTS	Cu <sup>2+</sup>	DTT, NaF, NaN <sub>3</sub>
<i>Trametes sanguinea</i>	0,106	ABTS	2,5-xyloidin	DTT, NaN <sub>3</sub>
<i>Trametes sanguinea</i> CeIBMD001	0,102	ABTS	2,5-xyloidin	močovina
<i>Trametes</i> sp.	0,177	ABTS	syringaldazin	NaCN, NaN <sub>3</sub>
<i>Trametes</i> sp. AH28-2	0,025	ABTS	syringaldazin	NaCN, NaN <sub>3</sub>

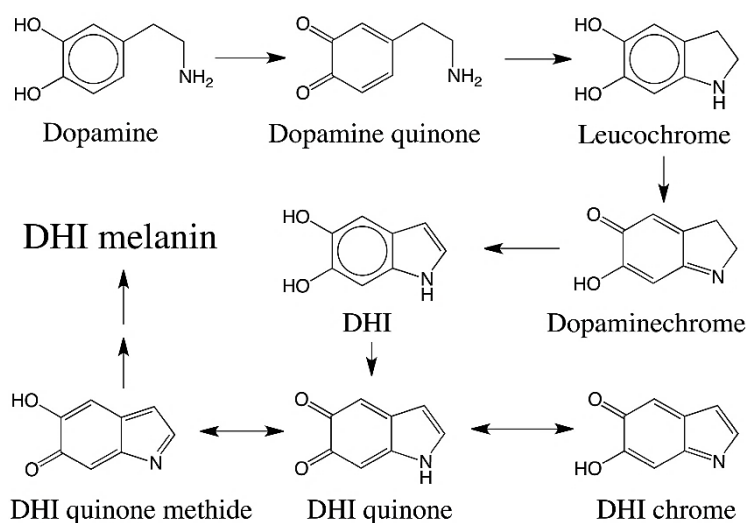
Poznámky: DTT; dithiothreitol, EDTA; ethylendiamintetraoctová kyselina; PHBA; *p*-hydroxybenzoová kyselina a SDS; dodecylsírán sodný.



**Tabulka 3.** Běžné hladiny neurotransmiterů v tělních tekutinách u zdravých jedinců.

Neurotransmitter	Obsah neurotransmiteru		Reference
	Moč [ $\mu\text{g}/24$ hodin]	Plasma [ $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	
Dopamin	65-400	<0,55	[14,16]
Serotonin	$\leq 200$	300-2000	[15]
Adrenalin	0,5-20	<0,7	[14,16]
Noradrenalin	15-80	<0,55-3,4	[14,16]

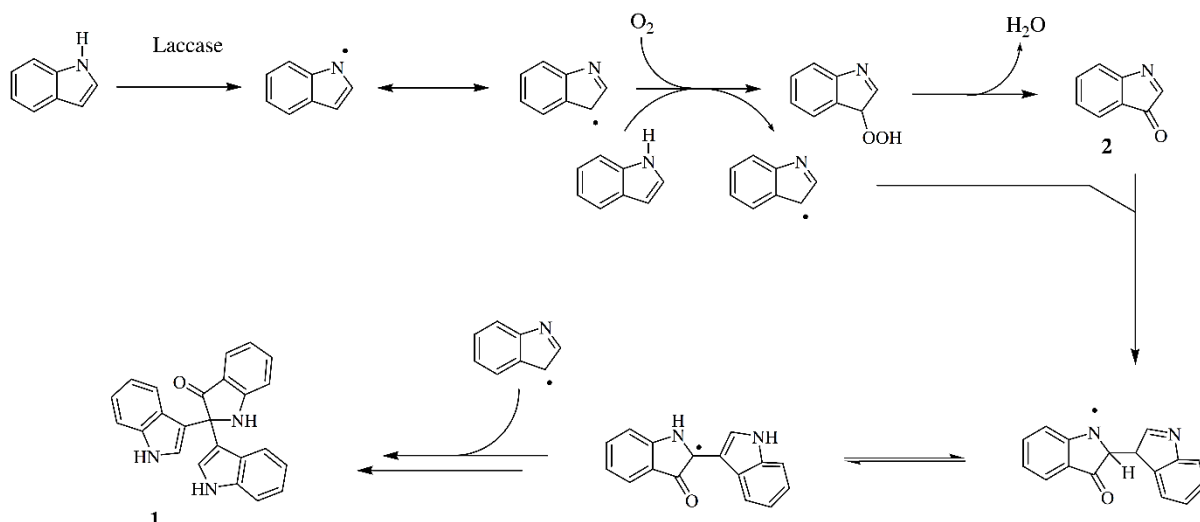
Tento meziprodukt je ale rovněž substrátem Lac, a tudíž je dále katalycky oxidován na indol-5,6-chinon, který podléhá polymerizační reakci za vzniku polydopaminu (analog melaninu), jak je znázorněno na Obr. 7 [17].



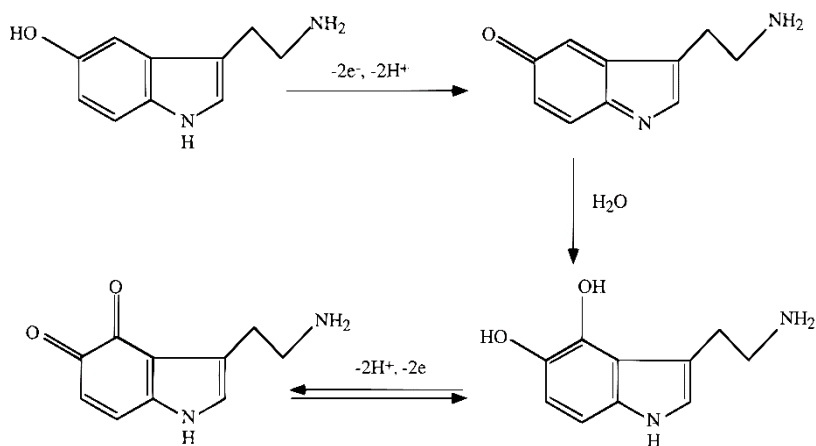
**Obrázek 7.** Oxidace dopaminu na vniku DHI melaninu [18].

Obdobně i serotonin (5-hydroxytryptamin, zkráceně 5-HT) ovlivňuje zásadně emoční rozpoložení, jelikož jeho hlavní funkcí je stabilizace nálady, stejně jako pocity štěstí a pohody. Kromě toho 5-HT také hraje roli v trávicím systému a spánkových cyklech. Tělo potřebuje serotonin, ale příliš mnoho nebo příliš málo může vést ke zdravotním problémům. Například příliš málo serotoninu může způsobit depresi. Příliš mnoho však může způsobit vzácný stav nazývaný serotoninový syndrom [15]. Využití Lac jakožto biorekogničního prvku při výrobě elektrochemických biosenzorů diskutabilní, jelikož ještě nebyly přesně definovány produkty katalytické oxidace 5-HT. Jelikož 5-HT představuje z chemického hlediska 5-hydroxyindol s bočním řetězcem s primární aminoskupinou, lze předpokládat, že dochází k polymeraci vzniklých radikálu indolu [19] jak je znázorněno na Obr. 8.

Na druhou stranu přítomnost hydroxy skupiny nabízí možnost tvorby fenoxyl radikálu, jenž se může rovněž podílet na spontánní polymeraci. Z těchto předpokladů není možné potvrdit, že katalytickou oxidací 5-HT vzniká odpovídající chinon-imin, jenž podléhá nukleofilní adici vody za vzniku 4,5-dihydroxyindolu, který může být dále oxidován až na odpovídající *o*-chinon [21], jak je uvedeno na Obr. 9.



**Obrázek 8.** Mechanismus vysvětlující trimerizaci indolu katalyzovanou lakázou [20].

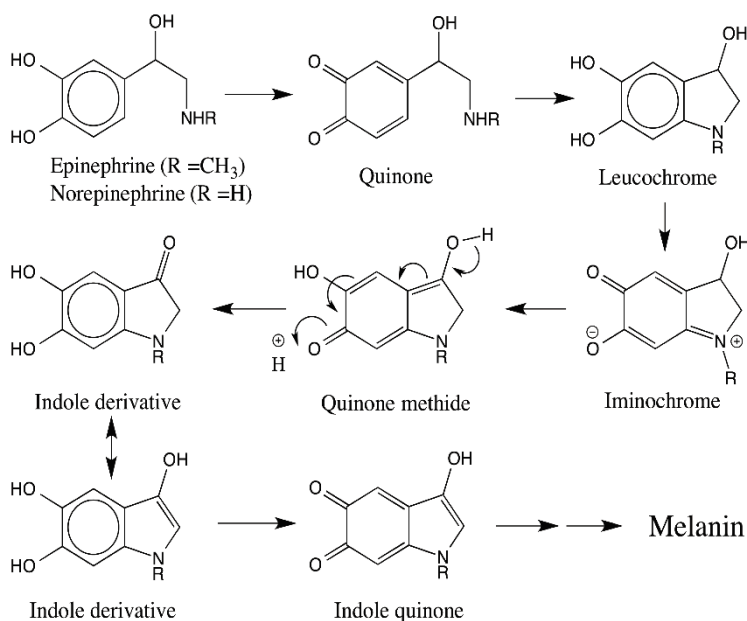


**Obrázek 9.** Elektrochemická oxidace serotoninu.

Jak již bylo dříve zmíněno, epinefrin, více znám jako adrenalin, je hormon vyměšovaný dřením nadledvin. Jeho hlavní funkce spočívá v přípravě těla na fyzickou a duševní zátěž (výkon), a je tudíž považován za základní hormon stresové reakce člověka. Společně s kortizolem se podílí na udržení organismu při životě při stresových situacích, přičemž působí proti sobě, neboť adrenalin způsobuje, že tělo podává extrémní výkony, zatímco kortizol brání před poškozením účinků adrenalinu.

Naproti tomu norepinephrin (noradrenalin) má více funkcí, protože jako stresový hormon se zdá, že ovlivňuje oblasti mozku, kde je řízena pozornost a reakce na různé podněty. V doprovodu adrenalinu je zodpovědný za zvyšující se tepovou frekvenci. Tradičně se vztahuje k motivaci, bdělosti na úrovni vědomí, regulaci spánku, chuti k jídlu, sexuálnímu a agresivnímu chování [22].

Z chemického hlediska se adrenalin od noradrenalinu liší v přítomnosti methylové skupiny na dusíku, tudíž lze adrenalin zařadit mezi sekundární aminy. Jakožto deriváty katecholu jsou oba neurotransmitery typickými substráty Lac, ale i dalších enzymů např. tyrozinázy. Jejich katalytickou (rovněž elektrochemickou) oxidací může vznikat až polymer strukturně velmi podobný melaninu, jak je zřejmé z Obr. 10.



**Obrázek 10.** Katalytická oxidace adrenalinu a noradrenalinu [23].

Hodnoty Michaelisovy konstanty ( $K_m$ ) v Tab. 5, určují afinitu enzymu k substrátu: nižší  $K_m$ , vyšší afinita enzymu k substrátu a vyšší  $K_m$ , nižší afinita. Konstanta  $K_m$  přírodního substrátu je menší než analogických substrátů. Pokud mají dva stejné enzymové substráty různé  $K_m$ , které představují vyšší  $K_m$  má nižší afinitu k enzymu a reakce probíhá vždy pomaleji než se substrátem nižším  $K_m$ . Poměr  $k_{cat}/K_m$  vyjadřuje rychlostní konstantu, která určuje katalytickou účinnost, jelikož  $k_{cat}$  představuje rychlostní konstantu katalyzované reakce. Toto měřítko účinnosti je užitečné při určování, zda je rychlost omezena vytvořením produktu nebo množstvím substrátu.

Když je  $k_{\text{cat}}$  mnohem větší, než  $K_m$  enzymový komplex přeměňuje větší část substrátu, který se váže na produkt. Tato zvýšená konverze může být pozorována jedním ze dvou způsobů: buď se substrát váže pevněji na enzym, což je důsledek relativně nízkého  $K_m$ , nebo je větší část substrátu, který je vázán, přeměněn před disociací, kvůli velké rychlosti obratu  $k_{\text{cat}}$ . Nízké  $k_{\text{cat}}$  než  $K_m$  vyjadřuje, že komplex přeměňuje menší část substrátu, který se váže na produkt.

Veličina  $K_i$ , Tab. 4, označuje inhibiční konstantu, používají se k popisu vazebné afinity, kterou má malá molekula nebo makromolekula k enzymu nebo receptoru. Inhibiční konstanta  $K_i$  také představuje disociační konstantu, ale spíše vazbu inhibitoru na enzym. To znamená ligand jehož vazba snižuje katalytickou aktivitu enzymu. Vazebná rovnováha popsána hodnotou  $K_i$  závisí na kinetickém mechanismu inhibice [24].

**Tabulka 4.** Kinetické parametry enzymatické katalýzy pro vybrané substráty [25].

Substrát	$k_{\text{cat}}/K_m$ [mmol $\cdot$ l $^{-1}\cdot$ s $^{-1}$ ]	$K_m$ [mmol $\cdot$ l $^{-1}$ ]	$K_i$ [mmol $\cdot$ l $^{-1}$ ]	Inhibitor
Hydrochinon <sup>[a]</sup>	88	2,1	0,18	Hydroxylamin <sup>[a]</sup>
Katechol <sup>[a]</sup>	103	1,11	1,33	Azid <sup>[a]</sup>
Hydrochinon <sup>[b]</sup>	110,3	—	1,25-1,8	Azid <sup>[b]</sup>
Dopamin <sup>[b]</sup>	—	0,11-122 <sup>[c]</sup>	—	—
Katechol <sup>[b]</sup>	—	0,014-2250 <sup>[c]</sup>	—	—

Poznámky: hodnoty pro <sup>[a]</sup>lakázu a <sup>[b]</sup>tyrosinásu, rozsah hodnot v závislosti na druhu tyrosinásu<sup>[c]</sup>

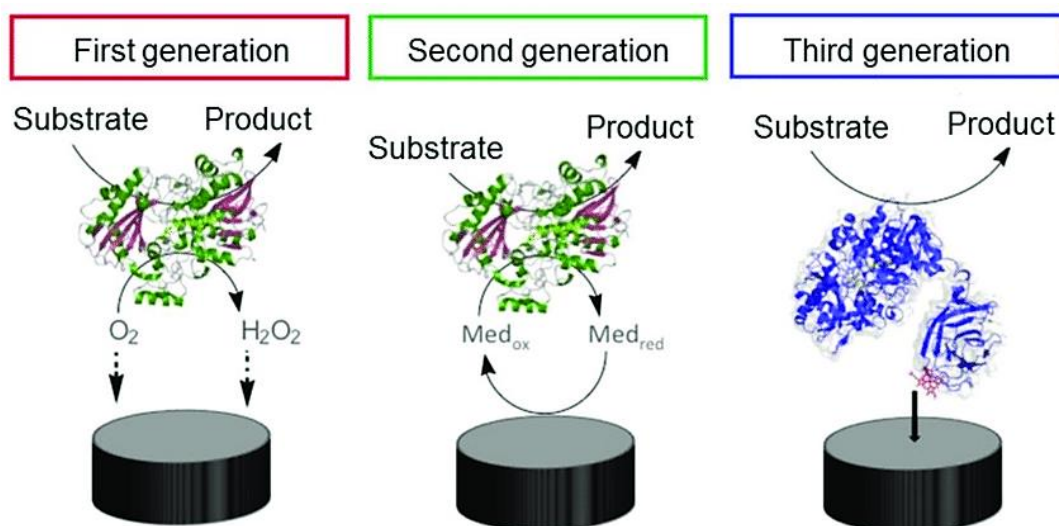
Mezi nejlepší substrát se řadí látka s nejnižším  $K_m$ , mezi které, dle Tabulky 4, může patřit v závislosti na podmínkách katechol, jehož  $K_m$  je nejnižší, tudíž má k němu enzym nejvyšší afinitu a reakce probíhá rychleji než u substrátu s vyšší  $K_m$ , u kterého jak již bylo zmíněno, probíhá reakce pomaleji.

## 2. Lakázové elektrochemické biosenzory

Lakázy jsou charakteristické svou širokou specifícností k nejrůznějším substrátům, selektivitou a relativně vysokou tolerancí vůči chemickým podmínkám. Jsou široce využívány jako biokatalyzátory pro environmentální aplikace, kdy navázány na přírodní nosiče slouží k odbourávání významných polutantů. Dále našly lakázy své uplatnění v papírenském a celulózovém průmyslu, a dokonce i v energetickém odvětví během výroby biopaliv. Nicméně využití ve velkém měřítku pro tyto aplikace je omezené kvůli menší provozní stabilitě a regeneraci těchto enzymů.

Kromě výše uvedených příkladů lze Lac využít jako selektivní prvek při konstrukci katalytických senzorů, jenž se označují jako lakázové biosenzory. Tyto biosenzory se skládají ze dvou základních částí, biorekogničního prvku (detektor) obsahující lakázu a převodníku (transduktoru). Pokud je tímto převodníkem elektroda, pak hovoříme o elektrochemickém lakázovém biosenzoru. Tento typ analytického zařízení dále musí obsahovat zesilovač signálu (amplifikátor) zabudovaný v potentiostatu/galvanostatu a zapisovač, nejčastěji PC. Elektrody mohou být zhotoveny z nejrůznějších vodivých materiálů (kovy, slitiny, různé formy uhlíku, atd) [28]. V závislosti na typu měřeného signálu, mohou být elektrochemické biosenzory rozděleny na konduktometrické, potenciometrické a voltammetrické/amperometrické.

Z určitého úhlu pohledu, je možné považovat Lac za detektor, který rozpoznává cílový analyt (substrát) a transduktor poté převádí odezvu na měřitelný signál. Jedinečnost biosenzoru spočívá v tom, že tyto dvě součásti jsou integrovány do jediného snímače. Tato kombinace umožňuje měření cílového analytu bez použití činidel. Elektrochemické biosenzory jsou obvykle založeny na produkci elektronů, vyplývající z elektrochemické oxidace či redukce vzniklých produktů enzymatické reakce (tzv. amperometrické biosenzory I. generace). Jestliže je přenos elektronů řízen pomocí přítomného redoxního mediátorů, pak se tyto senzory zařazují do II. generace. Biosenzory III. generace jsou založeny na přímém přenosu elektronů mezi aktivním centrem enzymu a elektrodou. Pro názornost jsou jednotlivé typy katalytických biosenzorů znázorněny na Obr. 11.

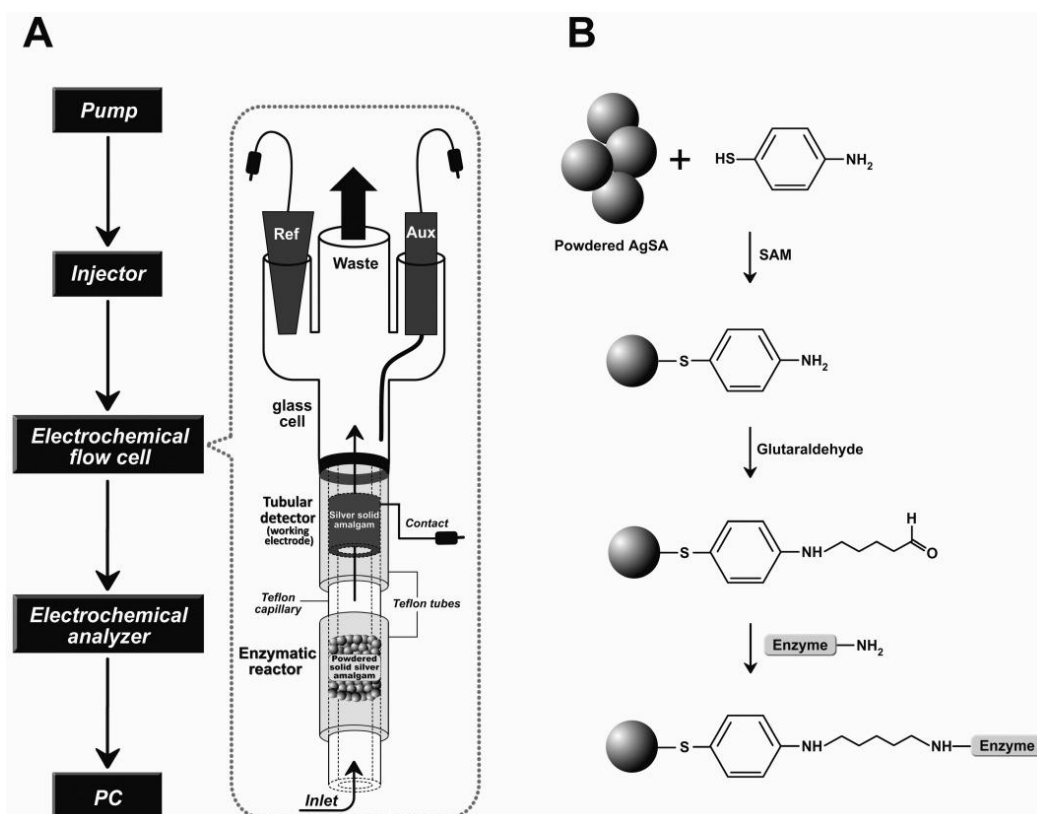


**Obrázek 11.** Schémata konfigurací enzymatických biosenzorů (s původními popisky v anglickém jazyce, dle [26]).

## 2.1. Stabilita a aktivita lakázových biosenzorů

Obecně lze konstatovat, že optimální rozsah pH pro fenolovou transformaci odpovídá oblasti při pH 6. Nicméně optimální pH pro houbové lakázy není vždy stejné a závisí na původu enzymu [27]. Kromě toho je nutné vzít i v úvahu optimální podmínky elektrochemické detekce vzniklých produktů, jenž u fenolických substrátů rovněž závisí na pH pracovního média. Tudíž výběr optimálního pH lakázových biosenzorů je kompromisem těchto dvou faktorů.

V jedné odborné studii, zabývající se stabilitou a katalytickou účinností Lac izolované z *T. versicolor* se prokázalo, že nejvyšší katalytickou aktivitu a stabilitu poskytuje v rozmezí pH 4 až 5 při teplotě 35 °C [28], tudíž pro praktické použití lakázových biosenzorů připadá v úvahu několik slabě kyselých pufrů. Mezi ně můžeme řadit například citrátový, acetátový, fosfátový, případně Britton-Robinsonův pufr. Kromě pracovních podmínek, rovněž způsob imobilizace může významně ovlivnit analytickou výkonnost biosenzorů. Pro lakázové amperometrické biosenzory, s imobilizovaným enzymem pouze na malé elektrodové ploše, byla dosažena životnost až na 10 měsíců a cca 900 měřeními [29]. V praxi se ukázalo mnohem efektivnější mít imobilizovanou lakázu v průtokných reaktorech (viz. Obr. 12), jenž kompenzují nízkou katalytickou aktivitu a stabilitu velkým množstvím zakotvených molekul enzymu [30].



Obrázek 12. Schémata průtokového lakázového reaktoru pro injekční analýzu [26].

## 2.2. Inhibitory jakožto potencionální interferenty

Katalytickou aktivitu lakáz většinou snižuje (inhibuje) přítomnost mnoha organických sloučenin, které mají komplexotvorné (chelatující) vlastnosti, a proto mohou vyvázat atomy mědi (modifikace aktivního místa), např. se jedná o EDTA, kyselinu citronovou, kyselinu šťavelovou, kyselinu malonovou a hydroxylamonium chlorid.

Mezi další významné interferenty lze zařadit ionty některých těžkých kovů ( $\text{Cd}^{2+}$ ), jelikož u kationtů  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  nebyla prokázána statisticky významná inhibice, ba naopak přítomnost nízké koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  může zvýšit aktivitu enzymu až o 17 %. Ovšem při vysoké koncentraci  $\text{Cu}^{2+}$  (od 2 do 80  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) bylo zjištěno, že aktivita Lac významně klesá (inhibována) [31]. Mezi další testované inhibitory se řadí cystein, kyselina thioglykolová (TGA), dithiothreitol (DTT), kyselina diethyldithiokarbamová a azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ), kdy posledně zmíněný  $\text{NaN}_3$  má silný inhibiční účinek. Naštěstí se u běžně analyzovaných klinických vzorků nevyskytuje [32]. Přehled dalších možných inhibitorů lze nalézt v online databázi BRENDA [25].

## 2.3. Možnosti kovalentní imobilizace lakázy na polymerní nosiče

Lakázové biosenzory je možné připravit nesčetně možnými způsoby, přičemž nejdůležitější roli hraje způsob zakotvení enzymu na povrch transduktoru (elektrody). Imobilizace slouží jako ideální technika pro zlepšení vlastností a reprodukovatelnosti měřeného signálu, protože poskytuje zvýšenou provozní stabilitu, tepelnou stabilitu, opakovanou použitelnost a toleranci vůči změnám iontových podmínek během katalýzy.

Lakázu je možné zakotvit (imobilizovat) na elektrodové povrchy fyzikálně či chemicky, kdy se chemický způsob (kovalentní vazba mezi apoenzymem Lac a elektrodou) ukázala mnohem efektivnější z důvodu vysoké stability [33]. Nosiče pro imobilizaci enzymů musí být netoxické, biokompatibilní a nerozpustné za reakčních podmínek, musí mít vysokou afinitu k proteinům, požadované funkční skupiny a tepelnou stabilitu. Důležitá je zejména jednoduchost regenerace, vysoká adsorpční kapacita a dostupnost podpory pro technologickou výrobu. Mezitím je výběr nosičů omezen s ohledem na bezpečnost jejich složek, chemickou stabilitu, odolnost vůči mikroorganismům a další faktory nezbytné pro potravinářský průmysl a biotechnologie [34].

Kovalentní vazba je založena na chemické aktivaci skupin v podpůrné matici tak, aby reagovaly s funkčními skupinami proteinového obalu Lac (apoenzymu). Tato metoda představuje vysokou stabilitu a umožňuje enzymu určitou odolnost vůči účinkům teploty a pH.

Zjistilo se, že imobilizovaný enzym kovalentní vazbou je obvykle stabilnější v reakčním systému, jelikož tato vazba zabraňuje vyplavování enzymů a zlepšuje stabilitu biovrstvy, přičemž musí být zachována její struktura, funkce a katalytická aktivita. Jelikož je tato diplomová práce věnována výhradně imobilizaci lakázových biosenzorů na vodivé polymery prostřednictvím tvorby Schiffových bází, nejsou další možné způsoby zakotvení dále popisovány.

Fyzikální vlastnosti polymerního nosiče, jako je velikost povrchu, pórovitost a množství funkčních skupin, lze snadno přizpůsobit v souladu s jejich specifickými vlastnostmi [35,29]. Pro kovalentní imobilizaci enzymů se osvědčily polymery s volnou primární skupinou, jako je chitosan a kolagen, jenž lze na elektrodu připravit pouhým kápnutím suspenze polymeru a vyschnutím rozpouštědla, tzv. drop-casting [36]. Mnohem efektivnějším se zdají být ale polymery připravené elektrodepozicí (polytaramin, polyarginin, polyhistamin, atd.) [37,38], jelikož je možné elektrochemicky řídit jejich tvorbu, tedy i získat požadované vlastnosti (výšku vrstvy a pórovitost). Samotná imobilizace spočívá v reakci mezi aminoskupinami polymeru a karboxylovými skupinami proteinu nebo ve spojování aminoskupiny polymeru s aminoskupinou proteinu pomocí specifických linkerů [39].

### **2.3.1. Příprava polymerů na vodivé materiály**

Následující kapitoly budou pojednávat o výrobě – syntéze polymerů. Polymer je makromolekula sestavená z molekul jednoho nebo více druhů atomů nebo skupin spojených navzájem v tak velkém počtu, že řada fyzikálních a chemických vlastností této látky se nezmění přidáním nebo odebráním jedné nebo několika konstitučních jednotek. To, co odlišuje polymery od jiných materiálů, je řetězcová struktura jejich molekul, tj. dlouhá lineární řada vzájemně spojených atomů nebo skupin atomů, jenž představuje převažující strukturní motiv, který může (ale nemusí) být občas přerušen místy větvením (např. u větvených nebo roubovaných polymerů, případně u polymerních sítí).

V některých případech polymery tvoří spíše rozvětvené sítě než jednotlivé řetězce. Bez ohledu na jejich tvar jsou molekuly velmi velké. Ve skutečnosti jsou tak velké, že je vědci klasifikují jako makromolekuly. Polymerní řetězce mohou obsahovat až stovky tisíc atomů – dokonce i miliony. Obecně platí, že čím delší je polymerní řetězec, tím těžší bude, a tím i vyšší hodnoty bodu varu či tavení bude mít. Z velikostí polymeru roste rovněž i jeho viskozita [40].

Vodivé polymery můžeme připravit třemi způsoby, procesem chemickým, elektrochemickým nebo fotoelektrochemickým. Syntéza polymerů skrz chemickou reakci spočívá v reakci s oxidačním, případně redukčním činidlem, kdy reakce vede k tvorbě nabitého komplexu, ten se naváže naproti-iont redoxního činidla. Tento proces vyžaduje vysokou



kontrolu, jelikož dochází k exotermnímu ději. Druhou možností, jakožto nejvýhodnější, je elektrochemická syntéza, kde dochází k elektrochemické deponaci polymeru na povrch elektrody. Při tomto typu polymerace je nutná aplikace dostatečně silného napětí nebo proudu. Fotoelektrochemická metoda představuje třetí možnou volbu pro syntézu polymeru, přestože mechanické vlastnosti výsledného polymeru nemusí být vždy dostačující pro tvorbu biosenzorů. Principem syntézy je fotoexcitace polymeru, založená na katalytickém účinku v přítomnosti světla, dochází tak k oxidaci monomeru za vzniku radikálů, jenž se spojují za tvorby polymeru [41].

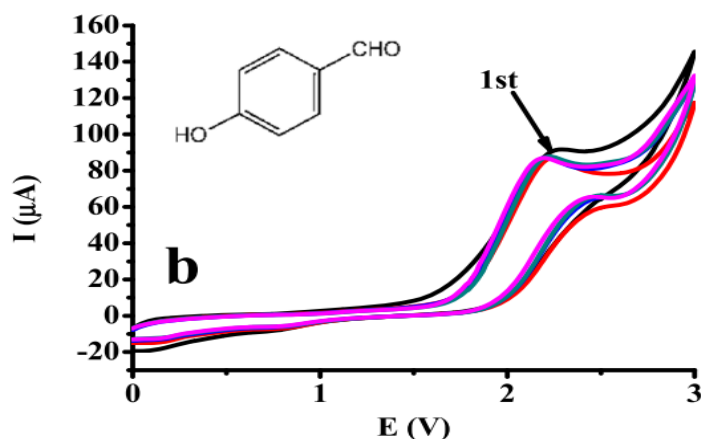
### **2.3.1.1. Polymery s volnou aldehydovou skupinou**

Polymery funkcionalizované volnou aldehydovou ( $R-CH=O$ ) nebo formylovou ( $Ar-CH=O$ ) skupinou se prakticky při výrobě biosenzorů neuplatňují, přestože reakce mezi přítomnou karbonylovou skupinou a aminovými zbytky proteinu za tvorby iminů (Schiffovy báze) by mohli být stejně efektivní, ne-li efektivnější než ty dosavadní způsoby. Z tohoto důvodu je tato diplomová práce zaměřena právě na přípravu takovýchto polymerů. Mezi již popsané polymery lze zařadit polyvanillin a polycurcumin [42,43]. Elektropolymeraci lze provádět, jak z vodných roztoků, tak i z organických rozpouštědel. V případě, kdy se polymerace zúčastňují radikály, bývá vhodnější elektropolymerace z organických rozpouštědel, kdy jsou elektrochemicky generované radikály mnohem stabilnější. Elektropolymerace může probíhat cyklickou voltametrií, ampérmetricky při konstantním napětí nebo galvanostaticky konstantním elektrickým proudem. Jako vhodné elektrodové substráty se osvědčily elektrody z platiny, zlata, skelného uhlíku, grafitu a uhlíkové pasty [44].

Tvorba polymeru se obvykle vyznačuje nárůstem kapacitního proudu ( $I_c$ ), jenž se projeví zvyšováním základní linie. Kromě toho je možné pozorovat úbytek monomeru, jak je ukázáno na Obr. 13, jenž zobrazuje několikanásobné cyklování 4-hydroxybenzaldehydu. Dále lze vzniklý polymer charakterizovat skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) a funkční skupiny identifikovat infračervenou mikroskopií se zeslabeným úplným odrazem (ATR-FTIR).

### **2.3.2. Navázání lakázy přes aminokyselinové zbytky**

Molekula Lac obsahuje na povrchu proteinů navázané aminokyseliny, jak bazické, tak i kyselé. Konkrétně cystein, methionin, histidin, případně i fenylalanin a leucin. Bazické aminokyseliny se dají použít pro navázání k polymeru s karbonylovými skupinami pomocí tvorby Schiffových bází.



**Obrázek 13.** Elektropolymerace 4-hydroxybenzaldehydu z acetonitrilu na povrch GCE pomocí opakující se cyklické voltametrie [44].

V tomto případě postačí ponořit transduktor s polymerem do roztoku enzymu po určité době. Druhou variantou může být použití flexibilního linkeru Jeffaminu, kdy dochází k reakci mezi karbonylovými skupinami polymeru s primárními amino skupinou linkeru a karbonylovými skupinami oxidovaných lakázových sacharidových zbytků. Navíc lze Jeffamin využít i pro kovalentní navázání volné primární amino skupiny tohoto linkeru přes enzym pomocí karboxylové skupiny provedením karbodiimidové reakce [45].

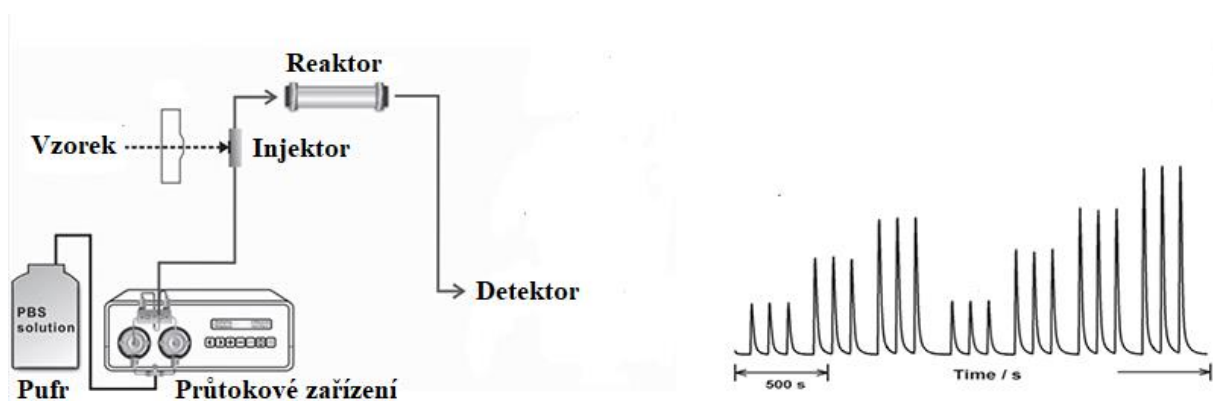
### 3. Lakázové biosenzory v průtočných systémech

Lakázové amperometrické biosenzory jsou speciální klasifikací voltametrických biosenzorů, kde je pracovní potenciál ( $E$ ) udržován konstantní v závislosti na čase ( $t$ ), přičemž se měří elektrický proud ( $I$ ) generovaný oxidací či redukcí na povrchu elektrody, který je udržován při vhodném potenciálu. Zaznamenaný proud má lineární vztah s koncentrací substrátu v roztoku ( $c$ ). Geometrie (tvar) lakázových biosenzorů se odvíjí od průtočné cely. V praxi dominují elektrody v plošném uspořádání, kdy celý elektrodový systém bývá natištěn na keramické platformy, tzv. tištěné elektrody [46]. Protože lakázové enzymy mají nízkou aktivitu ( $\geq 0,5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  z *Trametes versicolor*) v porovnání s tyrosinázou ( $\geq 1000 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  z *Agaricus bisporus*) nebo křenovou peroxidázou ( $150 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  z *Armoracia rusticana*), upřednostňuje se imobilizace Lac v průtočných reaktorech, kdy velké množství enzymu kompenzuje jeho nízkou aktivitu. Jelikož lze předpokládat, že připravené lakázové biosenzory využívající komerční tištěné uhlíkové elektrody nebudou mít dostatečnou citlivost, byla případně lakáza nahrazena některým z výše uvedených enzymů, aby se mohlo demonstrovat využití nově připravených polymerů v konstrukci průtočných biosenzorů.

### 3.1 Průtoková injekční analýza s amperometrickou detekcí

Průtoková injekční analýza (FIA) představuje analytickou instrumentální metodu s plynulým tokem vodícího roztoku, do kterého je vstřikován (injektován) roztok vzorku, který musí mít stejné složení jako vedoucí roztok (viz. Obr. 14). Tato podmínka je důležitá především pro amperometrickou detekci, kdy změny vodivosti během nástřiku mohou zapříčít změny měřeného elektrického proudu [47].

FIA může posloužit i k ověření mechanické stability elektrochemicky deponovaných polymerů, jelikož v teflonových hadičkách dochází k dynamickému ději (lineární proudění nosiče), jež minimalizuje možnou absorpci látek na povrch biosenzoru, ale může zapříčinit vymývání enzymu, či jiných komponent (redoxních mediátorů, nanočástic apod.). Samotné ověření se provádí porovnáním proudových intenzit, které by měly zůstat neměnné s daným objemem vzorku. Průtok se dá nastavit na určitou rychlost v závislosti na proudové odezvě, jež souvisí s rychlostí katalytické reakce a elektrochemické přeměně vznikajících produktů. Vkládané napětí se většinou pohybuje kolem 0 V kvůli možným negativním vlivům interferencí, kdy se nepředpokládá, že by se doprovodné látky zúčastnily rovněž elektrodových reakcí [48].



**Obrázek 14.** Schéma FIA s typickým záznamem pro tři stejná opakování [49].

Parametry (analytická výkonost) průtokové injekční analýzy a amperometrických detektorů (Lac a Tyr biosenzory) pro různé fenolové substráty se určují vždy za optimálních pracovních podmínek. Z dat uvedených v Tab. 5 lze usoudit, že Lac biosenzory jeví největší citlivost vůči *para*-substituovaným fenolům, následně vůči *ortho*- a *meta*-, které jsou stěží detekovatelné. Naproti tomu Tyr biosenzory jeví největší citlivost vůči *ortho*-difenolům a *para*-monosubstituovaným fenolům (volná *ortho* poloha pro katalyticky řízenou hydroxylaci). Slabší odezvu má ovšem i pro *meta*-, *methoxy*- a *hydroxy*-substituované fenoly [50].

**Tabulka 5.** Parametry průtokové injekční analýzy vybraných Lac a Tyr biosenzorů.

Substráty	$K_m$ [mmol·l <sup>-1</sup> ]	$I_{max}$ [μA]	LOD [mmol·l <sup>-1</sup> ]	Citlivost [μA·mol <sup>-1</sup> ·l]
Hydrochinon <sup>[a]</sup>	0,53	0,039	0,015	74
Katechol <sup>[a]</sup>	2,1	0,188	0,013	90
Dopamin <sup>[a]</sup>	0,57	0,022	0,030	39
Resorcinol <sup>[a]</sup>	0,39	0,006	0,065	15
Fenol <sup>[a]</sup>	0,35	0,005	0,067	15
Hydrochinon <sup>[b]</sup>	—	—	—	—
Katechol <sup>[b]</sup>	0,85	0,341	0,003	36
Dopamin <sup>[b]</sup>	0,32	0,03	0,012	94
Resorcinol <sup>[b]</sup>	—	—	—	—
Fenol <sup>[b]</sup>	0,13	0,012	0,012	92

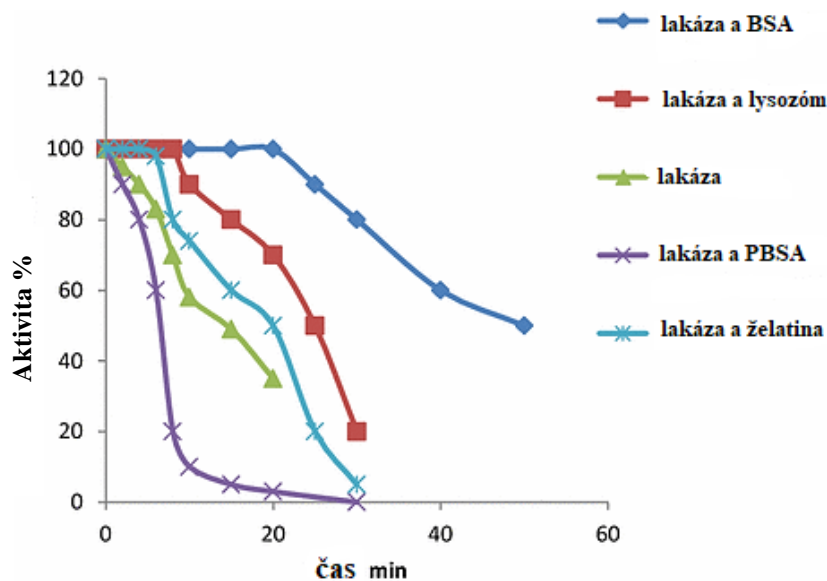
Poznámky: hodnoty pro <sup>[a]</sup> lakáza, <sup>[b]</sup> tyrosinása

### 3.2 Životnost biosenzorů v průtokové analýze

Obecným problémem mnohých enzymatických biosenzorů je nedostatečná provozní a skladovací stabilita potřebná pro rutinní a možné komerční využití. V současné době je tento problém hlavní překážkou, kterou je třeba v oblasti biosenzorů vyřešit. Nestabilita lakázových, tak i tyrosinázových biosenzorů úzce souvisí s aktivními centry těchto enzymů, v čistých standardních roztocích je způsobena především vznikajícími chinoidními sloučeninami, které podléhají polymeraci se vznikajícími radikály. Tyto nespecifické polymery mohou inaktivovat biokatalyzátor, tím že pokryjí celý aktivní povrch elektrody. Některé substráty jako katechol jsou schopné nevratně vyredukovat přítomnou měď až na atomární mocenství (atomy mědi v základním stavu; Cu<sup>0</sup>).

Studie provedené na různých imobilizačních metodách ukázaly, že síťovací imobilizační metoda pomocí bovinního sérového albuminu (BSA) přinesla nejlepší výsledky z hlediska provozní stability a aktivity Lac. Další studie provedené na mechanismu stabilizace Lac různými stabilizačními činidly na bázi proteinů (PBSA) ukázaly, že samotný BSA stabilizoval enzym pomocí hydrofobních interakcí lépe než v přítomnosti NaBr (viz. Obr. 12).

Rozpuštěný enzym v přítomnosti BSA si zachovává 100 % aktivitu po dobu 20 min během inkubace při 60 °C, zatímco volný enzym bez přítomnosti BSA si za stejných podmínek zachoval pouze 35 % aktivitu. Dále Obr. 15 demonstruje, jaký vliv může mít způsob imobilizace na životnost lakázových biosenzorů (společné zesílení s BSA > společné zesílení s lysozymem > společné zesílení s želatinou > hybridní > zachycení v želatině > zesíťování s glutaraldehydem). Prudký pokles aktivity imobilizované lakázy pro metodu síťování je pravděpodobně způsoben inaktivací enzymu přebytkem glutaraldehydu [51].



Obrázek 15. Aktivita lakázy na čase v závislosti na způsobu imobilizace [51].

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4. Laboratorní postup

Tato kapitola nabízí přehled chemikálií, laboratorního vybavení a stručný popis metodiky potřebné k dosažení stanovovaných cílů, tedy vytvoření polymerních vrstev opatřených s karbonylovou skupinou pro možné navázání lakázy, popřípadě jiného enzymu (tyrosinázy nebo alkalické fosfatázy). Jelikož tato diplomová práce není věnována vývoji konkrétní analytické metody, ale přípravě biosenzorů, neobsahuje tato část popis statistické analýzy.

#### 4.1 Chemikálie a reagenty

Chemikálie, jako vanilin ( $\geq 97\%$ ), *trans*-cinnamaldehyd ( $\geq 99\%$ ), 4-hydroxybenzaldehyd ( $\geq 95,0\%$ ), lyofilizovaný prášek tyrosinázy (EC 1.14.18.1) z hub ( $8503 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) s teplotou skladování  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , lakáza (EC 1.10.3.2) z *Trametes versicolor* ( $1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) se skladovací teplotou  $2-8\text{ }^\circ\text{C}$ , monohydrát fosforečnanu sodného (pAPP), hydrochinon, roztok glutaraldehydu (GTA) v  $\text{H}_2\text{O}$  ( $50\% \text{ w/w}$ ), hydrochlorid dopaminu, hydrochlorid ( $\pm$ )-epinefrinu, hydrochlorid DL-norepinefrinu ( $>98\%$ ) a hydrochlorid serotoninu, byly zakoupeny od společnosti Merck KGaA (Darmstadt, Německo). Další sloučeniny jako kyselina fosforečná ( $85\%$ ), kyselina sírová ( $95\%$ ), kyselina boritá ( $\geq 99,5\%$ ), hydroxid sodný, dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného a octan sodný ( $\geq 99,0\%$ ) pro přípravu pracovních roztoků pocházely od společnosti Lach-Ner, s. r. o. (Neratovice, Česká republika).

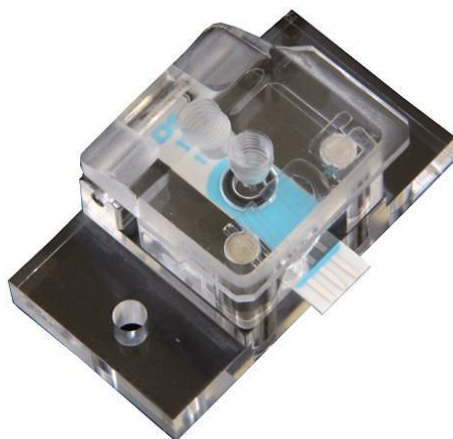
Pro přípravu lakázou modifikovaných uhlíkových pastových elektrod (CPE/Lac) se použil grafitový prášek o velikosti částic  $>2 \mu\text{m}$  od společnosti Graphite Týn, spol. s r.o. (Týn nad Vltavou, Česká republika) a silikonový olej (SO) o molekulové hmotnosti  $8000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  z Lučebních závodů a.s. (Kolín, Česká Republika). K přípravě roztoků byla použita demineralizovaná voda o elektrickém odporu  $\geq 18,3 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ , jež byla připravena pomocí čisticí jednotky Milli-Q<sup>®</sup> od společnosti Merck Millipore (Billerica, MA, USA).

## 4.2 Přístrojové vybavení

Veškerá voltametrická měření probíhala v konvenčním tříelektrodovém uspořádání, které se skládalo z tištěné uhlíkové elektrody (SPCE, typ DRP-C110) od Metrohm DropSens (Oviedo, Španělsko), která sloužila spolu s uhlíkovou pastovou elektrodou modifikovanou lakázou (CPE/Lac) jako pracovní elektroda. Dále toto uspořádání obsahovalo chloridostříbrnou referenční elektrodu opatřenou solným můstkem obsahujícím  $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl od Metrohm Česká republika, s.r.o. (Praha, Česká republika). Třetí elektrodou byl platinový plíšek pořízen z firmy Elektrochemické detektory, spol. r. o (Turnov, Česká republika), jež sloužila jako pomocná elektroda.

Přístroj VEGA3 SBU od společnosti TESCAN s.r.o. (Brno, Česká republika), byl využit k popisu mikrostruktury polymerních vrstev a povrchové distribuce kovalentně vázaných molekul enzymů, a to díky rastrovací elektronové mikroskopii (SEM) a energeticky disperzní rentgenové analýze (EDX). Pro dosažení většího zvětšení ( $6,64\times 10^3$ ) byly elektrody potaženy 5 nm vrstvou ryzího zlata pomocí rotační pumpované potahovací jednotky (typ Q150R Plus) zakoupené od Quorum Technologies (Lewes, Spojené království). Přítomnost karbonylových skupin v elektrochemicky deponovaných polymerech byla potvrzena infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací se sníženou celkovou odrazivostí (ATR-FTIR) na přístroji Nicolet<sup>™</sup> iS50 FTIR od Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup> (Waltham, Massachusetts, USA).

Amperometrická měření se provedla s použitím průtokové injekční analýzy. Zařízení se skládalo z vícekanálového peristaltického čerpadla MINIPULS 3 od Gilson, Inc. (Middleton, USA), automatického šestistupňového dávkovacího ventilu Rheo-dyne<sup>®</sup> od IDEX Health & Science GmbH (Wertheim, Německo), průtokové cely (viz Obr. 16) od Metrohm DropSens (Oviedo, Španělsko) a z počítače s operačním softwarem NOVA 1.11, který sloužil k ovládání potenciostatu/galvanostatu AUTOLAB (model PGSTAT101).



**Obrázek 16.** Průtoková cela se zabudovanou tištěnou uhlíkovou elektrodou [52].

### 4.3 Příprava pracovních elektrod

Ke stanovení optimálních podmínek a k charakterizaci katalytických vlastností enzymu byla použita uhlíková pastová elektroda bez přítomnosti enzymu (CPE) a uhlíková pastová elektroda se zakomponovaným enzymem (CPE/Lac). Trojce různých polymerů byla elektrochemicky deponována na povrch komerční SPCE, poté byly takto vzniklé varianty dále modifikovány enzymy. Detailní popis přípravy jednotlivých biosenzorů je popsán níže.

#### 4.3.1 Příprava modifikované uhlíkové pastové elektrody

Uhlíková pastová elektroda (CPE), která se využívala pro porovnání proudové odezvy vůči enzymem modifikované variantě, byla připravená z uhlíkového prášku (80 %; *w/w*) a ze silikonového oleje (20 %; *w/w*). Uhlíková pastová elektroda s přítomnou lakázou (CPE/Lac), která se využívala pro stanovení optimálních podmínek aktivity enzymu, byla připravena ze 70 % (*w/w*) grafitového prášku, 20 % (*w/w*) silikonovým olejem a 10 % (*w/w*) lakázy. Směs byla homogenizována v třecí misce s tloučkem po dobu 10 min a vzniklá pasta se následně plnila do teflonového elektrodového držáku, který byl opatřen kovovým pístem pro vodivé spojení. Obnovování pracovního povrchu se provádělo vytlačení zhruba 1 mm pastového válečku a důkladným leštěním o suchý filtrační papír.

#### 4.3.2 Příprava polymerních nosičů na tištěných elektrodách

Elektropolymerace probíhala za použití cyklické voltametrie (50 cyklů) s rozdílnými podmínky pro jednotlivé vybrané monomery. Mezi zvolené monomery patřil vanilin, *trans*-cinnamaldehyd a 4-hydroxybenzaldehyd.

Roztoky monomerů o objemu 10 ml a koncentraci  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  byly připravovány přímo v měřicí voltametrické nádobce, přičemž u *trans*-cinnamaldehydu z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě posloužila směs 7 ml ethanolu a 3 ml  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  jako pracovní médium. Roztoky vanilinu a 4-hydroxybenzaldehydu byly připraveny jejich rozpuštěním ve fosfátovém pufru o pH 7. Elektrodepozice polyvanilinu probíhala v potenciálovém rozsahu od  $-0,8$  do  $+1,8 \text{ V}$ , poly-*trans*-cinnamaldehydu od  $-0,6$  do  $+2,0 \text{ V}$ , a poly-4-hydroxybenzaldehydu od  $-0,6$  do  $+2,0 \text{ V}$ , při rychlosti skenování  $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  a potenciálovém kroku  $5 \text{ mV}$ .

#### 4.3.2.1 Imobilizace enzymů na karbonylem funkcionalizované polymery

Vybraný enzym (přednostně lakáza) se na deponovaný polymer navázal kovalentně za vzniku Schiffových bází (iminů) [42]. Kovalentní imobilizace probíhala nanesením  $5 \mu\text{l}$  roztoku enzymu o koncentraci  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v příslušném pufru na povrch elektrody s polymerem. Po 20 min došlo opět k nanesení  $5 \mu\text{l}$  enzymatického roztoku. Následně, aby nedošlo k zaschnutí, musela být po dobu 2 hodin přikapávána demineralizovaná voda o objemu  $5 \mu\text{l}$ . Po uběhnutí 2 hodin došlo k přidavku  $2,5 \mu\text{l}$  glutaraldehydu a opět bylo nezbytné přikapávat vodu po dobu 1 hodiny. Celý postup s glutaraldehydem se znovu zopakoval pro dokonalé zesílení molekul enzymů. Na závěr se elektroda nechala vysušit, opláchlá vodou a suchá skladovala se v ledničce.

#### 4.4 Příprava pracovních roztoků

Roztoky neurotransmiterů (hydrochlorid dopaminu, hydrochlorid ( $\pm$ )-epinefrinu, hydrochlorid DL norepinefrinu ( $>98 \%$ ) a hydrochlorid serotoninu) o objemu 10 ml se připravovaly vždy čerstvé o koncentraci  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  okyselené vodě (přídavek  $100 \mu\text{l}$   $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  HCl) z důvodů použití hydrochloridů, jenž nejsou stabilní v neutrálním prostředí, jelikož podléhají autooxidačním procesům. Samotná elektrochemická měření se uskutečňovala v pufrovaných roztocích, tak aby se zajistilo konstantní pH během experimentů. Fosforečnanové a fosfátové pufrы o objemu 500 ml a pH 4,5, 5 a 7 se připravily slitím  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  roztoků kyseliny fosforečné, hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu sodného. Acetátový pufr o koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a pH 4,5 se připravil ze zásobního roztoku kyseliny octové a octanu sodného o koncentracích  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Britton-Robinsonovy pufrы o pH 4,5 vznikly smícháním  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  NaOH do roztoku kyselin fosforečné (85 %), borité a ledové octové (99,8 %).



Požadované pH jednotlivých pufrů bylo kontrolováno pH metrem WTW intoLab® pH 720 od společnosti Xylem Inc. (Washington, D.C., USA). Všechny pufrы se skladovaly při pokojové teplotě.

#### 4.5 Parametry použitých technik

Veškerá měření se prováděla za laboratorních podmínek při teplotě 25 °C. Podmínky cyklické voltametrie použité při elektrodepozici polymerů jsou již popsány výše. Pro charakterizaci lakázy se zvolila cyklická voltametrie v potenciálovém od -0,4 (nebo -0,2) do +1,0 V, se skenovací rychlostí 10 mV·s<sup>-1</sup> a potenciálovým krokem 5 mV, který byl při každém měření neměnný. Aby bylo možné sledovat velmi pomalé katalýzy, musela být místy skenovací rychlost snížena až na 5 mV·s<sup>-1</sup>. Tato měření se provádělo v několika pufrech o různém pH, aby se vybralo optimální prostředí pro enzymatickou přeměnu.

Pro FIA s amperometrickou detekcí u vybraných neurotransmiterů na tištěných uhlíkových elektrodách potažených pouze polymerem se zvolil konstantní pracovní potenciál o hodnotě +0,1 V. Jelikož se dále FIA měření prováděla pouze na tyrosinázových biosenzorech z důvodu nízké aktivity lakázy, tak jako nosič posloužil 0,1 mol·l<sup>-1</sup> fosfátový pufr o pH 7 o průtoku 1 ml·min<sup>-1</sup>, při pracovním potenciálu -0,2 V. V obou případech FIA byla doba analýzy nastavena až na 5000 s při časovém intervalu 0,1 s.

Před každou analýzou bylo nezbytné promýt dávkovací smyčku novým modelových roztokem neurotransmiteru, jenž byl rovněž připraven ve stejném výše uvedeném pufru, tak aby proudová odezva neodpovídala pouze změně vodivosti nosiče. Před samotným nadávkováním (vždy minimálně 3 stejné injektáže) se nechala průtoková cela s přítomným biosenzorem alespoň min promývat, aby se vymyly adsorbované molekuly enzymu.

## 5. Výsledky a diskuse

Praktická část se věnuje hledání optimálních pracovních podmínek pro dosažení maximální katalytické aktivity zakotveného enzymu. Obecně platí, že se katalytická účinnost enzymů může významně lišit v důsledku jejich kovalentní vazby s elektrochemicky deponovaným polymerem. Dále citlivost odvozených biosenzorů bude úměrná s množstvím navázaného enzymu, tedy s dostupností karbonylových skupin na povrchu polymerů. Tyto skutečnosti se zohledňovaly v průběhu optimalizace, kdy získané výsledky jsou vždy průběžně diskutovány. Pro přehlednost je celá kapitola rozdělena do dílčích podkapitol.

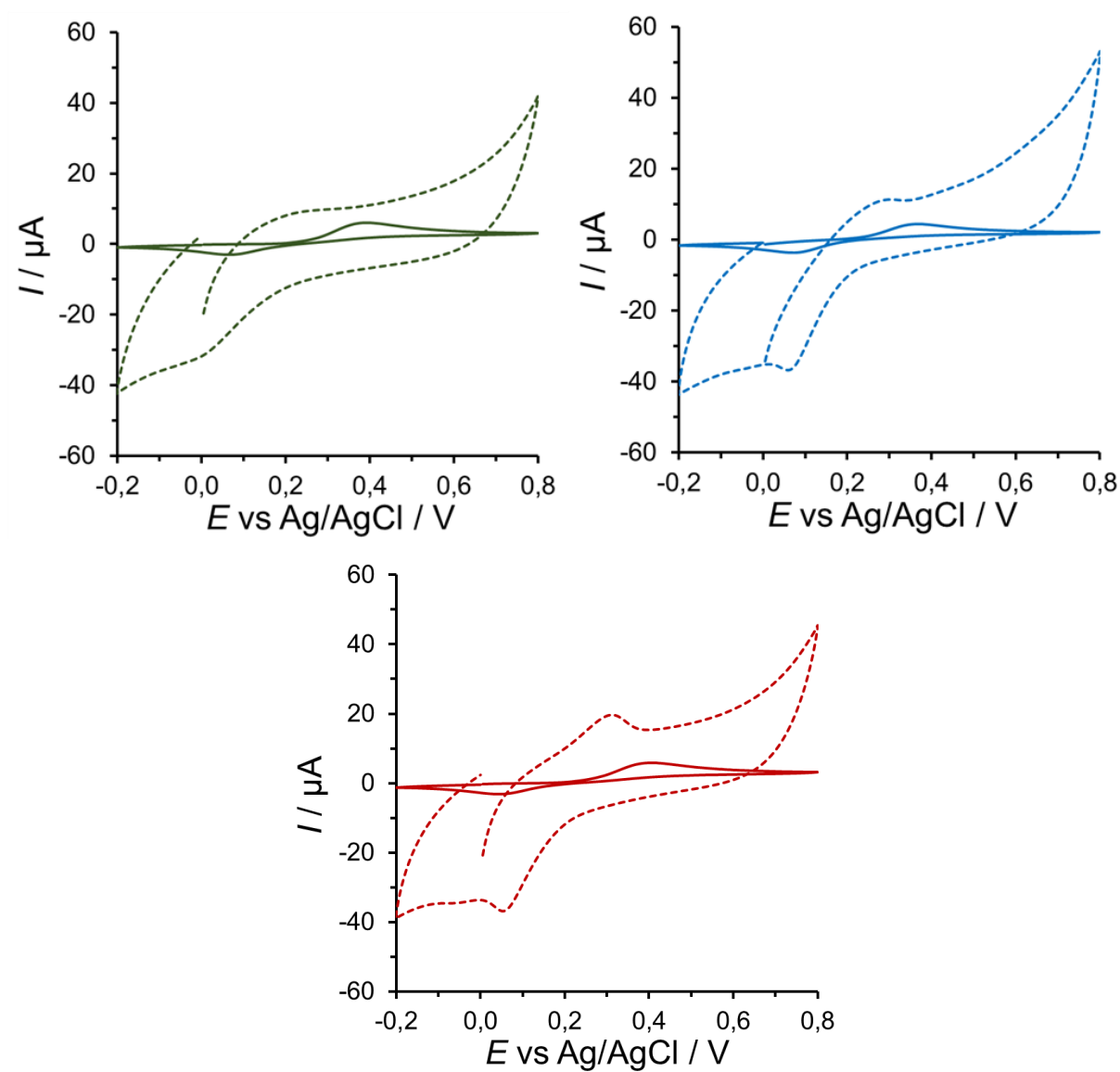
### 5.1 Složení pracovního média

Jelikož se katalytická aktivita enzymu mění v závislosti na podmínkách prostředí (pH, iontová síla, přítomnost inhibitorů, teplota, atd), bylo nutné vybrat optimální složení pracovního média, jenž by zaručoval konstantní pH v průběhu analýz s příslušnými biosenzory. Mezi nejčastěji používaná média se řadí citrátový, acetátový a fosfátový pufr, jak je zřejmé z Tab. 1. Proto se také acetátový (AcB), fosforečnanový (PB) a Britton-Robinsonův pufr (BRB) o stejné koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a pH 4,5 podrobily bližšímu zkoumání, jenž spočívalo v porovnávání cyklických voltamogramů (viz. Obr. 17)  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  hydrochinonu obdržených na nemodifikované CPE (celé) a CPE/Lac (přerušované čáry) ve výše zmíněných pufrch. Hydrochinon byl vybrán záměrně jako vhodný substrát, jelikož jeho oxidační produkt (ortho-chinon) je rovněž elektroaktivní, a lze tedy elektrochemicky monitorovat jeho přírůstek.

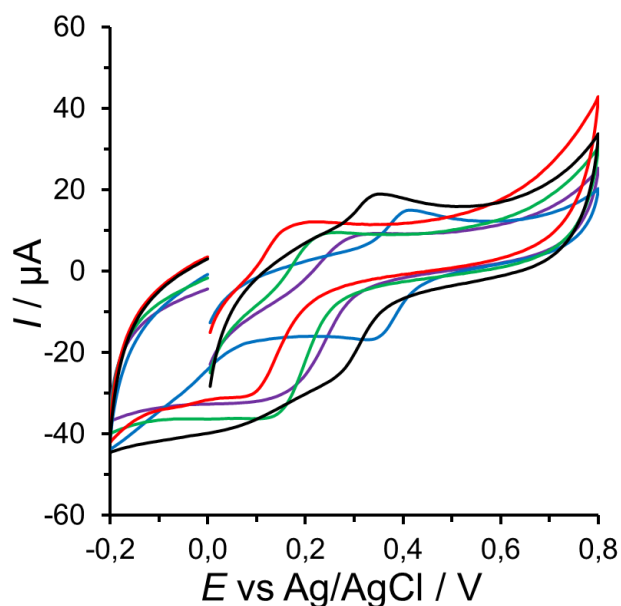
Velmi nízká hodnota rychlosti skenování byla použita záměrně, protože při vyšších hodnotách není možné elektrochemicky sledovat příspěvek enzymatické katalýzy. Jelikož přítomný hydrochinon lze i elektrochemicky oxidovat na *ortho*-chinon. Tato přeměna je reverzibilní a tudíž typické redox páry byly získány na nemodifikované CPE. Katalytická aktivita lakázy se projevila snížením oxidačního píku (oxidace vzdušným kyslíkem katalyzovaná enzymem), ale za to významným zvýšením redukčního píku *ortho*-chinonu. Největší rozdíl mezi těmito signály se zjistil pro fosforečnanový pufr, jenž se zvolil za optimální.

Z důvodu široké škály pH, ve kterém má lakáza katalytickou aktivitu, bylo nezbytné najít optimální pH pro dosažení maximální aktivity. Z tohoto důvodu musely být připraveny roztoky fosforečnanového pufru o pH 2, 3, 4, 5 a fosfátového pufru o pH 6, které spadají do rozmezí přijatelných hodnot. Optimum se nachází mezi pH 4 až 5 [28]. Z porovnání cyklických voltamogramů (viz. Obr. 18) lze usoudit, že pH 5 představuje hledané optimum. Nejvyšší rozdíl

anodického a katodického píku vypovídá o optimální katalytické aktivitě při pH 5. Z tohoto důvodu byl zvolen fosforečnanový pufr o pH 5 pro další experimenty.



**Obrázek 17.** Cyklické voltamogramy  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydrochinonu obdržené na CPE (celá) a CPE/Lac (přerušovaná čára) v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  acetátovém (zelené), fosforečnanovém (modré) a Britton-Robinsonově pufru (červené čáry) při rychlosti skenování  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

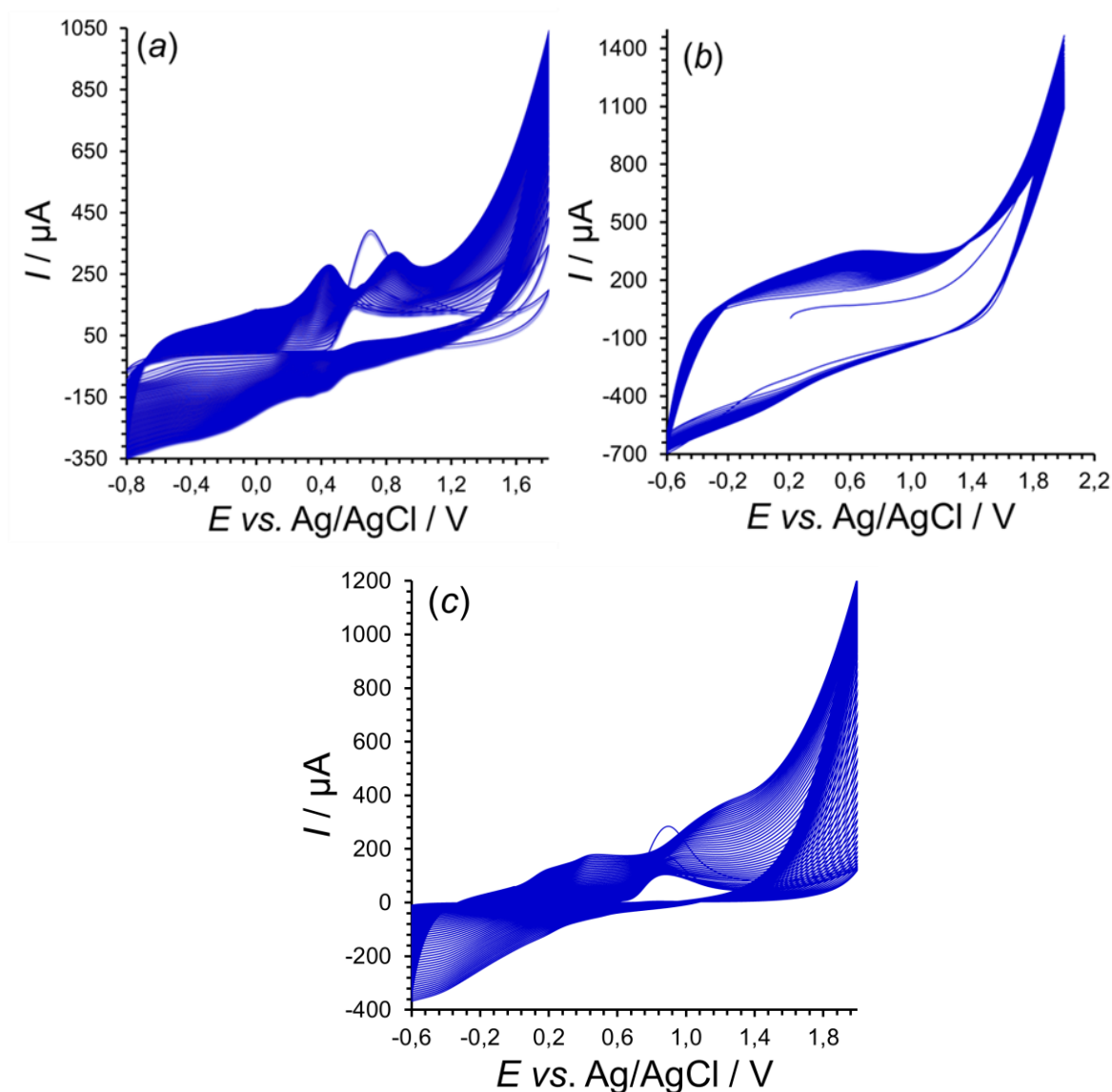


**Obrázek 18.** Cyklický voltamogram  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydrochinonu obdržen na CPE v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosforečnanovém pufru o pH 2 (modrá), 3 (černá), 4 (fialová), 5 (zelená) a v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosfátovém pufru o pH 6 (červená čára) se skenovací rychlostí  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

## 5.2 Elektrochemická polymerace monomerů s karbonylovou skupinou

Polymerní nosiče, obsahující karbonylovou skupinu pro kovalentní navázání enzymu, se deponovaly elektrochemicky prostřednictvím metody cyklické voltametrie. Jelikož pouhé cyklování v anodickém okně od 0 do +2 V nebylo dostačující pro vznik polymeru, musela se cyklická voltametrie v 50 cyklech provádět v potenciálovém rozsahu od  $-0,8$  do +2 V (viz. Obr. 19). Rychlost skenování nebyla detailně optimalizována, jelikož lze předpokládat, že při nízkých rychlostech skenování se bude polymer tvořit velmi pomalu, přičemž lze předpokládat, že vzniklý polymer bude mít kompaktnější strukturu než při použití velmi vysokých hodnot skenování. Jelikož se nízké hodnoty skenování neosvědčily, byla zvolena rychlost skenování  $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , jenž byla dostačující na pokrytí pracovní plochy SPCE.

Vznik polymeru indikuje nárůst pozadí po jednotlivých cyklech, jelikož vznikající polymer zhoršuje nabíjení povrchu elektrody, tedy tvorbu elektrodové dvojvrstvy [53]. Kromě toho lze každým cyklem pozorovat významný pokles prvotního oxidačního píku indikující spotřebu monomeru a nárůst následných signálů. Odevzdání elektronu a protonu (anodická oxidace) vybraných monomerů způsobí vznik radikálů jenž se dále pospojují za tvorby odpovídajícího polymeru.



**Obrázek 19.** Elektrochemická polymerace prostřednictvím cyklické voltametrie (50 cyklů)  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  vanilinu v  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  PB o pH 7 (a),  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  *trans*-cinnamaldehydu rozpuštěného ve směsi  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 96% ethanolu (3:7) (b),  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  4-hydroxybenzaldehydu v  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  PB o pH 7 (c), na SPCE při skenovací rychlosti  $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Experimentálně bylo zjištěno, že je vhodné provádět elektropolymeraci vanilinu a 4-hydroxybenzaldehydu v neutrálním prostředí, na rozdíl od *trans*-cinnamaldehydu, jehož elektropolymerace se musela provádět v kyselém prostředí za přítomnosti alkoholu, z důvodu jeho nízké rozpustnosti. Jelikož pouhým okem nebylo možné potvrdit úspěšnou elektrodepozici připravených polymerů (patrný tmavší odstín SPCE) a přítomnost karbonylových skupin, musela se k potvrzení tvorby polymerní vrstvy použít skenovací elektronové mikroskopie

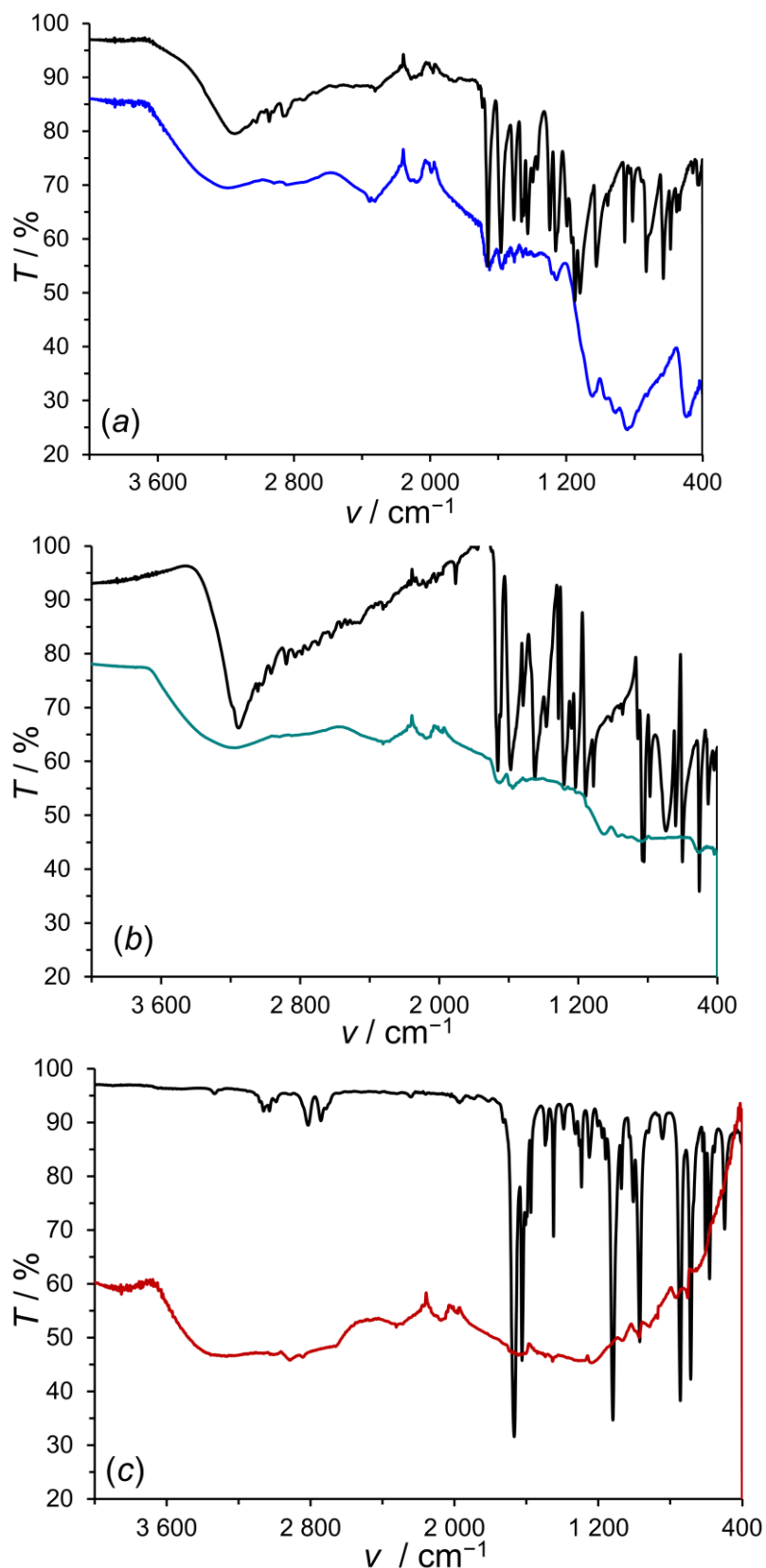
(SEM) a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací se sníženou celkovou odrazivostí (ATR-FTIR).

### 5.2.1 Identifikace karbonylových skupin infračervenou spektroskopií

V infračerveném (IR) spektru organických sloučenin se karbonylové skupiny vyznačují pásy v oblasti valenčních vibrací  $\nu$  (C=O),  $\nu$  (O-H),  $\nu$  (C-H). Porovnáním spekter polymerů a použitých monomerů si lze povšimnout, že pásy polymerů mají oproti monomerům výrazně slabší intenzity (viz. Obr. 20). Ty ovšem i tak stačí k prokazatelnosti přítomnosti karbonylových skupin. Pásy  $\nu$  (C-H) při  $\sim 3000\text{-}3080\text{ cm}^{-1}$  ve všech IR spektrech tří polymerů potvrzují přítomnost aromatického jádra.

Karbonylové skupiny se vyznačovaly typickými dvěma absorpčními pásy oblastí  $\nu$  (C-H)  $\sim 2850\text{-}2940\text{ cm}^{-1}$  a  $\nu$  (C=O)  $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ . Intenzity těchto pásů se v případě polyvanilinu a 4-hydroxybenzaldehydu dosti lišily, ale u obou polymerů byly prokazatelné. V případě polyvanilinu, bylo možné prokázat přítomnost methoxy skupiny na aromatickém kruhu  $\nu$  (C-O) při  $1050\text{ cm}^{-1}$ , čímž se dokázalo, že methanol není odstupující molekulou během elektropolymerace vanilinu. Nejintenzivnější pásy byly pozorovány pro polyvanilin, což značí, že se vanilin ochotněji polymeruje než 4-hydroxybenzaldehyd, a to z důvodu přítomnosti již zmíněné elektron-donorové methoxy skupiny na benzenovém jádře.

U IR spektra poly-*trans*-cinnamaldehydu bylo již vyhodnocení charakteristických pásů obtížné, a to v důsledku velmi nízké vrstvy polymeru. Tvrzení lze podpořit i tím, že *trans*-cinnamaldehyd neobsahuje ve své struktuře fenolovou skupinu v *para* či *ortho* poloze, jenž by se mohla zúčastnit elektropolymerizace.

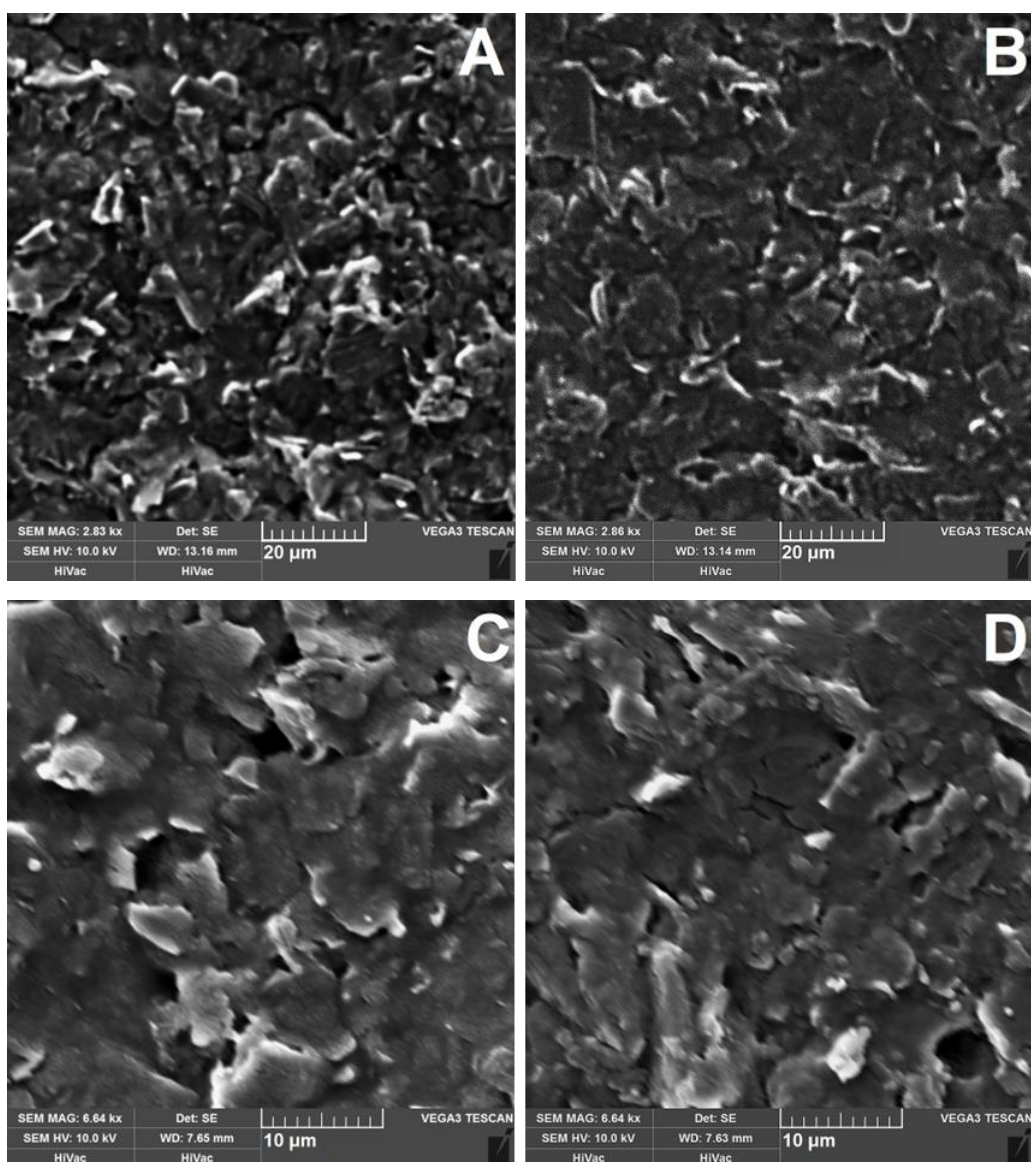


**Obrázek 20.** FTIR spektra vanilinu a polyvanilinu (a), 4-hydroxybenzaldehydu a poly-4-hydroxybenzaldehydu (b), *trans*-cinnamaldehydu a poly-*trans*-cinnamaldehydu (c).

Pásky monomeru jsou označeny černou barvou.

## 5.2.2 Charakterizace karbonylem-funkciovaných polymerů

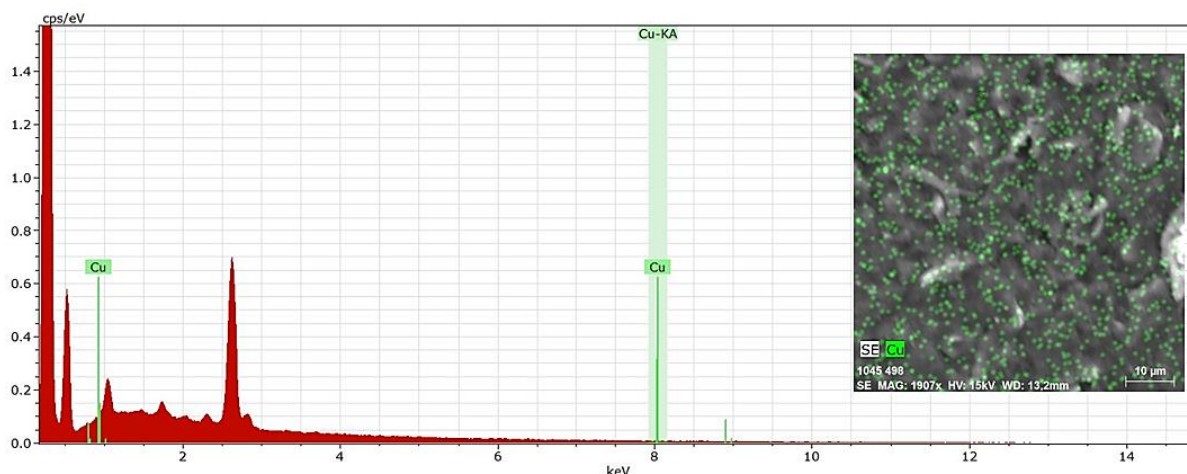
Pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) se porovnávala mikrostruktura nemodifikovaného povrchu SPCE s deponovanými karbonylem-funkcionovanými polymery. Níže Obr. 21 nabízí jednotlivé snímky pořízené SEM metodou. Na snímku (A) si lze povšimnout holého povrchu SPCE tvořený částicemi grafitu, jenž jsou spojeny tenkou vrstvou pojiva. Tmavé povlaky polyvanilinu na grafitovém povrchu dokazují přítomnost tohoto polymeru (B), přičemž na snímcích (C) a (D) je přítomnost polymerů s navázanými molekulami enzymu mnohem patrnější, neboť povrch SPCE neobsahuje ostré hrany grafitu, nýbrž kompaktní pokrytí.



**Obrázek 21.** SEM snímek čisté SPCE (A), SPCE pokryté pouze polyvanilinem (B), poly-*trans*-cinnamaldehydem s navázanou tyrosinázou (C), 4-hydroxybenzaldehydem a navázanou tyrosinázou (D).



Dále se přistoupilo k mapování povrchu metodou EDX, díky které lze s jistotou prokázat přítomnost navázaného enzymu. Toto prokázání je realizováno na základě znalosti, že tyrosináza obsahuje dva atomy mědi ve svém aktivním centru [54]. Kromě toho může EDX analýza daného elementu posloužit k mapování distribuce molekul enzymu na povrchu použitého polymeru (viz. Obr. 22).



**Obrázek 22.** EDX spektrum při mapování přítomnosti mědi u tyrosinázy navázané na poly-4-hydroxybenzaldehydu.

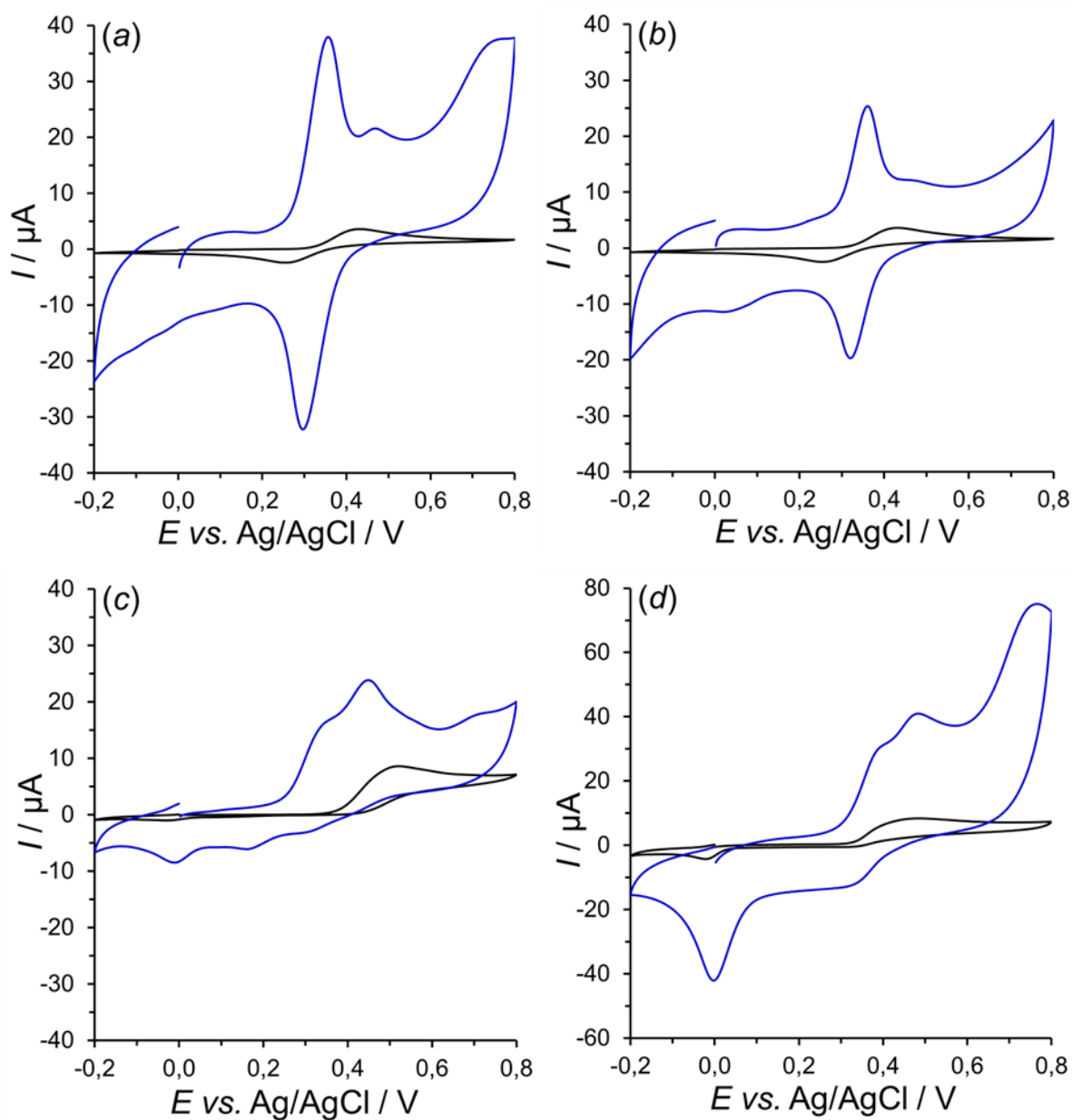
Za zmínku stojí říct, že EDX analýza nebyla prováděna s čerstvým biosenzorem, ale s biosenzorem použitým již při několika předchozích měření metodou FIA. Tento přístup posloužil i k důkazu, že i po zhruba třiceti minutovém omývání povrchu biosenzoru, nedocházelo k významnému vymývání molekul enzymu, což rovněž dokazují konstantní proudové odezvy pro sérii opakovaných injektáží.

### 5.3 Elektrochemické chování neurotransmiterů na polymerních substrátech

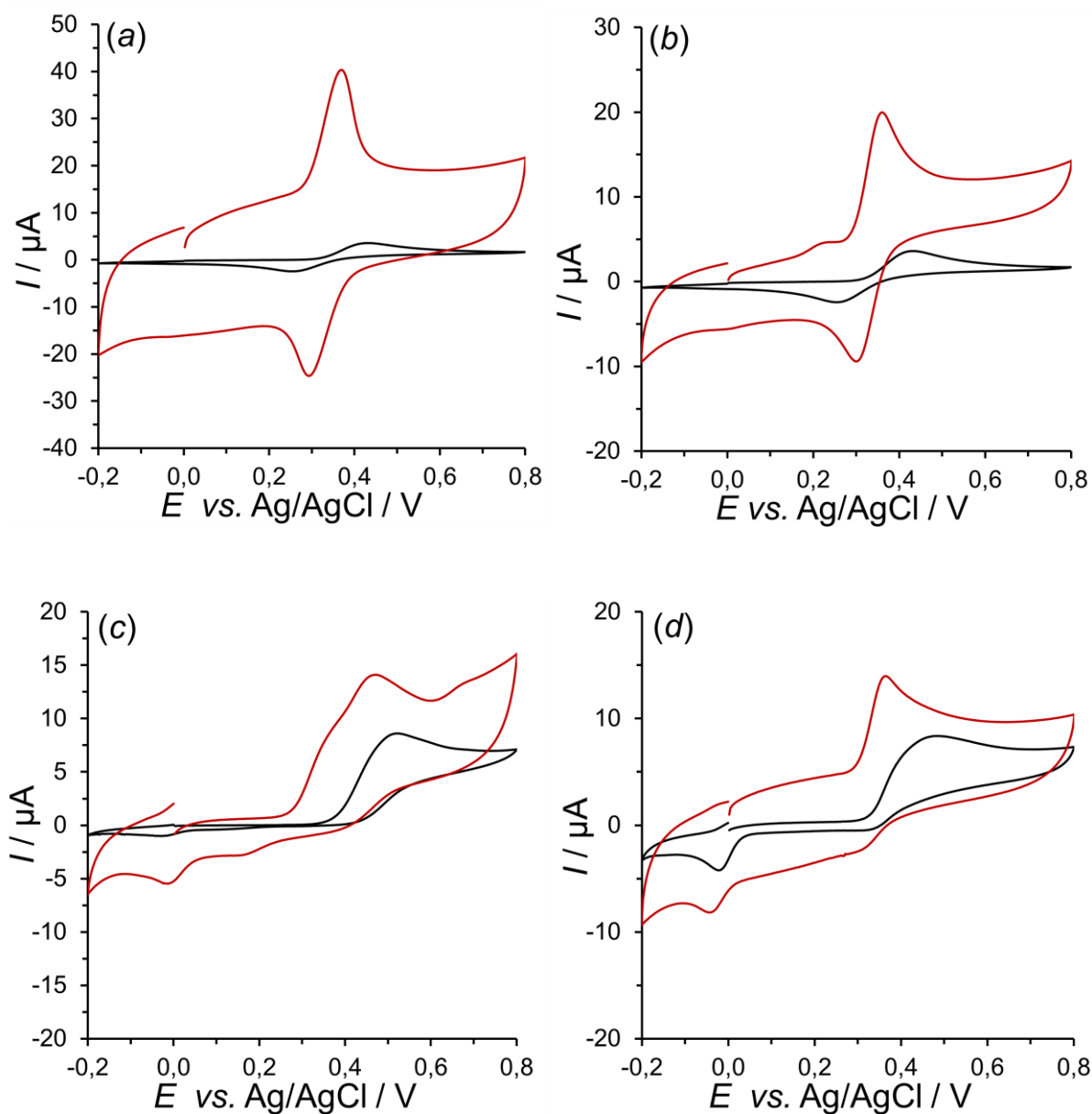
Karbonylem-funkciované polymery by mohly představovat vhodné povrchové modifikace při vývoji citlivých voltametrických senzorů pro stanovení dusíkatých biologicky aktivních látek, jelikož lze předpokládat vysokou afinitu látek s aminoskupinou k takovýmto polymerům. Tento předpoklad byl potvrzen voltametrickým měřením vybraných katecholaminů (dopamin, adrenalin, noradrenalin) a indolu s bočním řetězcem s primární amino skupinou (serotonin). Všechny tyto látky představují tzv. neurotransmitery (hormony) [42,43].

Porovnáním proudových odezev katecholaminů, jenž se reverzibilně oxidují na příslušné *ortho*-chinony a redukují zpět na katecholy (redoxních páry) za účasti dvou elektronů a dvou protonů [55], se zjistilo, že tyto sloučeniny poskytují mnohonásobně vyšší proudové

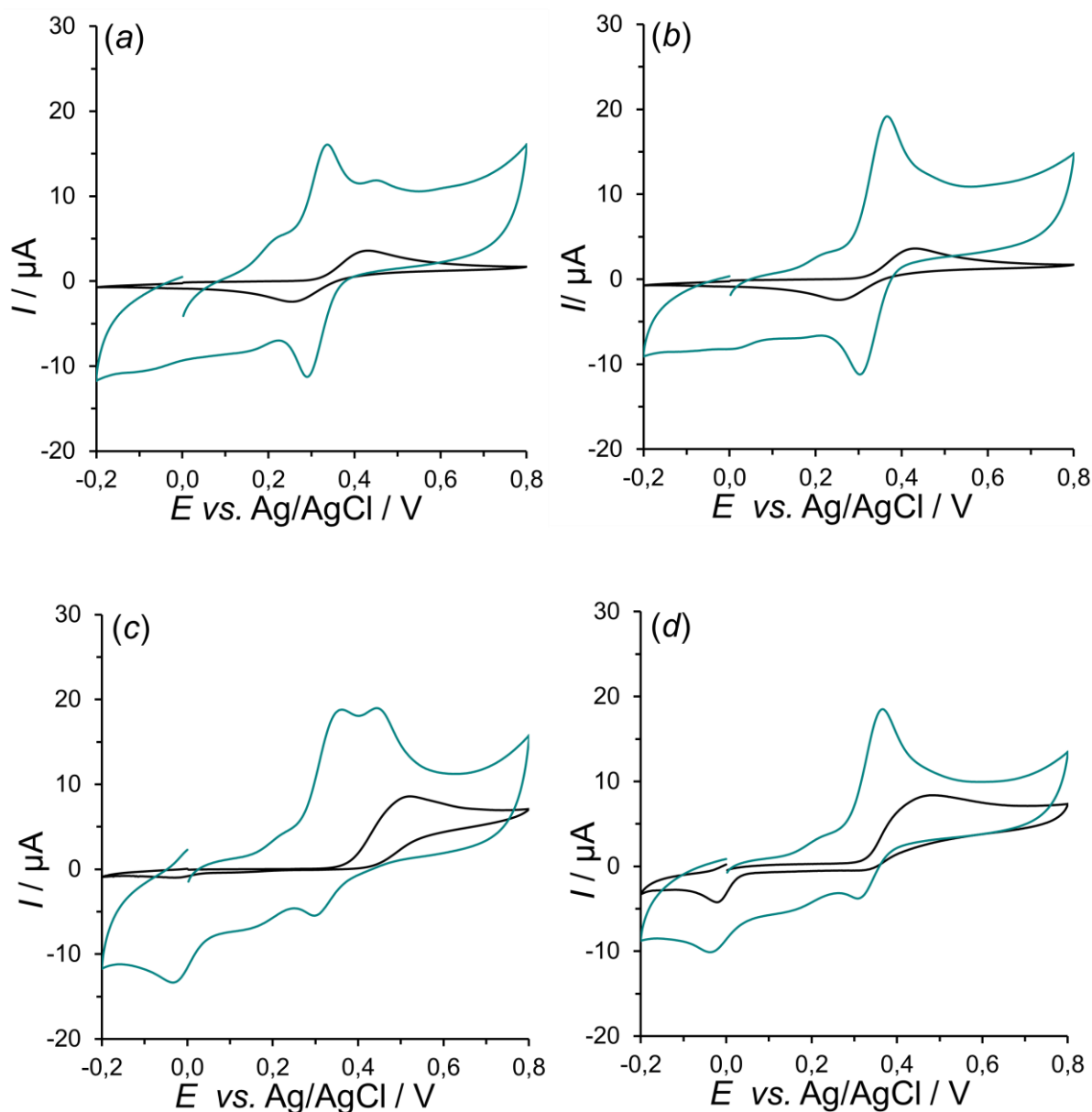
výtěžky na SPCE pokrytých karbonylem-funkcionovanými polymery než na nemodifikované SPCE (černé cyklické voltamogramy na Obr. 23; 24; 25).



**Obrázek 23.** Cyklické voltamogramy  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dopaminu (a), noradrenalinu (b), serotoninu (c), adrenalinu (d), obdržené na SPCE (černé) a na SPCE s polyvanilinem (modré křivky) v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosforečnanovém pufru o pH 5 při rychlosti skenování  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Obrázek 24.** Cyklické voltamogramy  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dopaminu (a), noradrenalinu (b), serotoninu (c), adrenalinu (d), obdržené na SPCE (černé) a na SPCE s poly-*trans*-cinnamaldehydem (červené křivky) v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosforečnanovém pufru o pH 5 při rychlosti skenování  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .



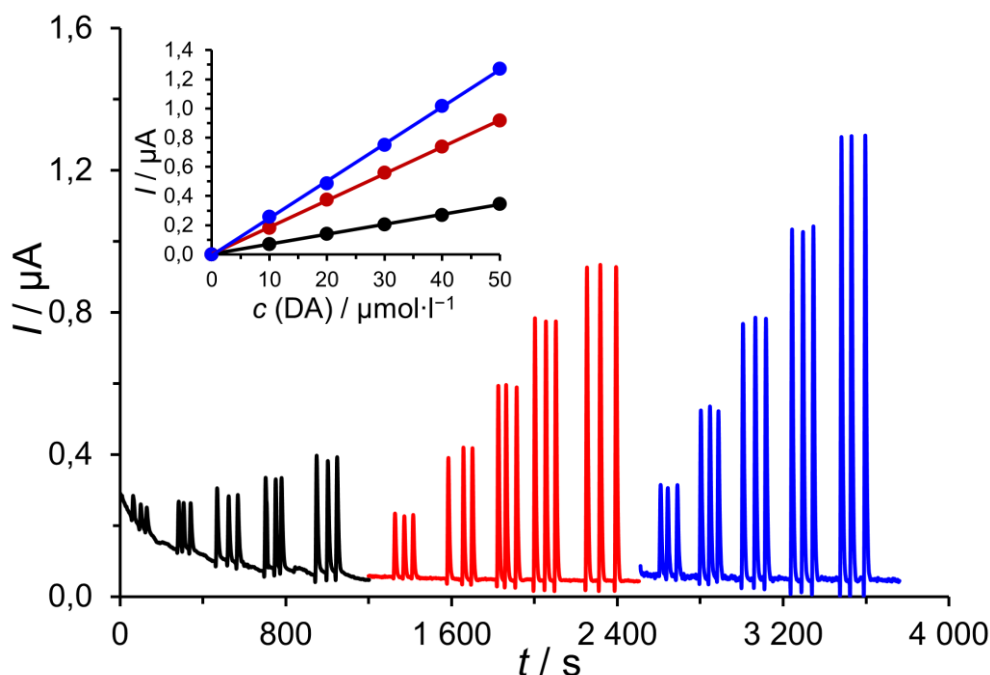
**Obrázek 25.** Cyklické voltamogramy  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dopaminu (a), noradrenalinu (b), serotoninu (c), adrenalinu (d), obdržené na SPCE (černé) a na SPCE s poly-4-hydroxybenzaldehydem (zelené křivky) v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  fosforečnanovém pufru o pH 5 při rychlosti skenování  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Detailnějším vyhodnocením cyklických voltamogramů můžeme říct, že pro voltametrické stanovení dopaminu byl nejideálnější polyvanilin, jelikož poskytoval nejvyšší proudové odezvy a zároveň nejnižší pozadí. Obdobně tomu bylo i v případě měření roztoků s přísadkou noradrenalinu a serotoninu.

### 5.2.3 FIA neurotransmiterů s karbonylem-funkciovánými polymery

Amperometrická detekce dopaminu v průtokovém injekčním uspořádání na karbonylem-funkciovánými polymerech dokazuje výsledky předchozích experimentů. Na Obr. 26 jsou zobrazeny typické FIA záznamy oxidace 10-50  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$  dopaminu (DA) při +0,4 V na čisté SPCE, SPCE pokryté poly-*trans*-cinnamaldehydem a SPCE s filmem polyvanilinu. Porovnání FIA záznamů opět potvrzuje významné zlepšení citlivosti pomocí jednoduché elektrochemické modifikace povrchu elektrody, kdy se dospělo ke shodě s předchozími experimenty, jelikož nejvyšší proudové výtěžky poskytoval opět polyvanilin.

Dle konstantních výšek tripletových signálů můžeme potvrdit stabilitu signálu pro opakovaná měření, což znamená že nedochází k jeho pasivaci produkty oxidace, které rovněž mohou polymerovat [60]. To je nejspíš způsobeno dynamickými podmínkami FIA, kdy nedochází k adsorpci na povrch elektrody z důvodu proudění nosiče. Polymery s karbonylem-funkciovánými polymery tak představují velmi slibný způsob modifikace pracovních elektrod v budoucím vývoji elektroanalytických metod pro stanovení elektroaktivních dusíkatých organických látek, tedy nejen neurotransmiterů.

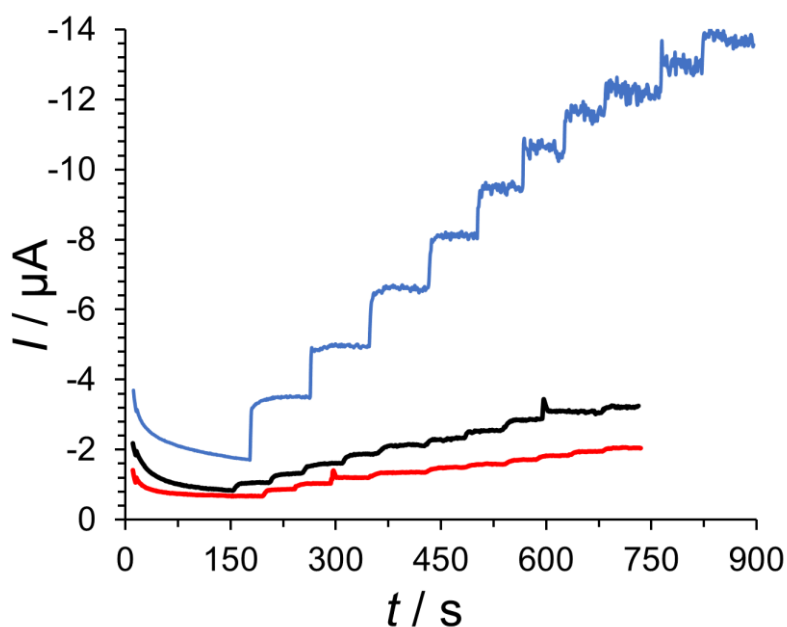


**Obrázek 26.** Amperogramy z měření pro kalibraci dopaminu (DA) na čisté (nemodifikované) SPCE elektrodě (černá), na SPCE s poly-*trans*-cinnamaldehydem (červená) a na SPCE s polyvanilinem (modrá).

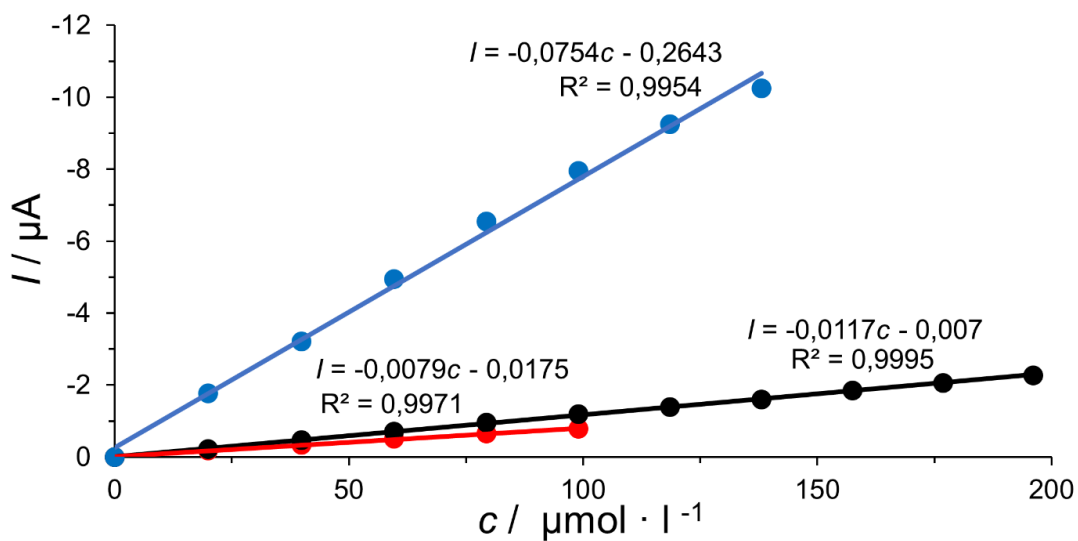
#### 5.2.4 Amperometrická detekce neurotransmiterů v sádkovém uspořádání

Po imobilizaci lakázy na karbonylem-funkciované polymery pomocí tvorby Schiffovy bázi (iminů) a následnými experimenty s takto připravenými biosenzory, se dospělo k závěru, že nízká katalytická aktivita použité lakázy nedovoluje dosáhnout dostatečné citlivosti. Proto se lakáza musela nahradit jiným enzymem, a to tyrosinásou, jehož katalytická aktivita je několika násobně větší, jak je patrné z dat uvedených v Tab. 5.

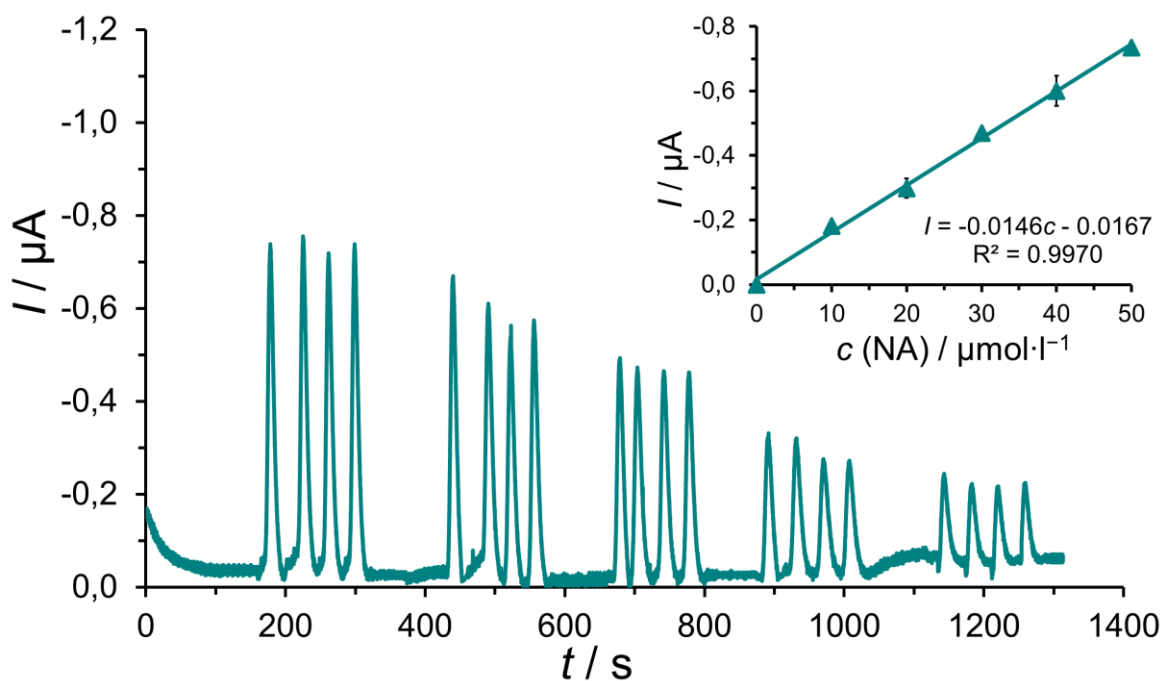
Amperometrickou detekcí (viz. Obr. 27), prováděnou v sádkovém uspořádání s 10 nástřiky (0,01 mol·l<sup>-1</sup> roztoků neurotransmiterů) po 10 μl do 10 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> fosfátového pufru o pH 7 při konstantním napětí -0,2 V a rychlosti míchání 400 rpm, se po odečtení proudových hladin ( $\Delta I$ ) pro jednotlivé injekce sestrojily kalibrační závislosti, které jsou zobrazeny na Obr. 28. V tomto případě se pracovalo s nemodifikovanou SPCE s imobilizovaným enzymem tyrosinázou pomocí zesílení glutaraldehydem. Na základě kalibrační závislosti, kdy minimální hodnota koeficientu determinace ( $R^2$ ) byla rovná 0,994, se stanovila analytická výkonost jednoduchého tyrosinázového biosenzoru bez přítomnosti karbonylem-funkciováných polymerů. Nejvyšší citlivost (0,0754 μA·mol<sup>-1</sup>·l) byla zjištěna pro dopamin, což reflektuje katalytickou aktivitou tyrosinázy z *Agaricus bisporus* vůči studovaným neurotransmiterům. Z důvodu velmi nízkých proudových odezev pro serotonin, nebylo možné určit odpovídající analytické parametry.



**Obrázek 27.** Amperogramy (sádkové uspořádání) získané na čisté SPCE s tyrosinásou, po 10 injekcích 10 μl 0,01 mol·l<sup>-1</sup> dopaminu (modrá), noradrenalinu (černá) a adrenalinu (červená křivka), do 10 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> fosfátového pufru o pH 7 při konstantním napětí -0,2 V a rychlosti míchání 400 rpm.



**Obrázek 28.** Kalibrační závislost neurotransmiterů pro koncentrace od 10 do 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  dopamin (modrá), noradrenalin (černá), adrenalin (červená křivka).



**Obrázek 29.** Amperogram kalibračního měření noradrenalinu ( $10\text{-}50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) získaný na SPCE s poly-4-hydroxybenzaldehydem a tyrosinásou. FIA se prováděla v  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  fosfátovém pufru o pH 7, s pracovním potenciálem  $-0,2 \text{ V}$ , injekčním objemem  $100 \mu\text{l}$  a průtokem  $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

**Tabulka 6.** Výkonost SCPE s imobilizovanou tyrosinásou bez přítomnosti polymerů.

Substrát	Lineární rozsah / $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$R^2$	LOD / $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	RSD / %
Adrenalin	od 21 do >100	0,9971	6,40	10,8
Dopamin	od 16 do >150	0,9954	5,09	8,2
Noradrenalin	od 6 do >190	0,9995	1,84	3,03

Poznámka: RSD; relativní směrodatná odchylka pro 10 nástřiků ( $N=10$ ).

Pro potvrzení, že polymery mohou být vhodnou konstrukcí katalytických biosenzorů, se provedla modelová analýza s kovalentně vázaným enzymem tyrosinásy na elektrochemicky deponovaný poly-4-hydroxybenzaldehyd. Typický FIA záznam na Obr. 29 potvrzuje skutečnost, že elektrodeponované polymery s karbonylovou funkční skupinou mohou zprostředkovat velmi stabilní vazbu s molekulami enzymů pro vývoj velmi stabilních biorekognizačních vrstev budoucích katalytických biosenzorů. Téměř konstantní proudové odezvy čtyřech po sobě jdoucích identických injekcí (kvarteta) noradrenalinu (NA) potvrzují vysokou mechanickou stabilitu navázané tyrosinásy. Opakovatelnost byla charakterizována hodnotou RSD menší než 5 %. Veškerá tyto fakta svědčí o tom, že molekuly enzymu nejsou během analýzy vymývány a také pasivovány (blokování přístupu analytu k aktivnímu centru) produkty katalýzy, což by se jinak projevilo významným poklesem signálu.

Porovnáním citlivosti modifikované SPCE pokryté zesítěnou tyrosinásou ( $0,0079 \mu\text{A}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$ ) a SPCE s elektrochemicky deponovaným poly-4-hydroxybenzaldehydem s kovalentně navázanou tyrosinásou ( $0,0146 \mu\text{A}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$ ) vůči noradrenalinu (NA) lze dojít k závěru, že je možné dosáhnout dvounásobně vyšší citlivosti. Navíc je nutné si uvědomit, že pracovní podmínky FIA analýzy nebyly nikterak zvlášť optimalizované.



## 6. Závěr

V této práci se zkoumaly možnosti využití elektrochemicky deponovaných karbonylem-funkciovaných polymerů při konstrukci lakázových, popřípadě tyrosinázových biosenzorů. Srovnáním intenzit absorpčních pásů jednotlivých polymerů, vyvolaly monomery bez hydroxylové skupiny (*trans*-cinnamaldehyd) lehké pochybnosti o jeho využitelnosti, jelikož výsledný polymer se vyznačoval velmi nízkými intenzitami, které svědčily o špatné polymeraci *trans*-cinnamaldehydu.

Naštěstí srovnáním proudových odezev obdržných voltamogramů a amperogramů se došlo k závěru, že i poly-*trans*-cinnamaldehyd spolu s ostatními polymery poskytují několikanásobně vyšší odezvy než nemodifikované uhlíkové tištěné elektrody. Za velkou výhodou lze považovat reprodukovatelnost přípravy polymerních vrstev, jejichž tvorba je zcela kontrolována podmínkami cyklické voltametrie, kdy bylo zapotřebí několikanásobné cyklování.

Na tyto polymery se dají imobilizovat různé druhy enzymů velmi jednoduchým a nenáročným postupem, kdy se využívá tvorba Schiffových bází. Nicméně z důvodu nízké katalytické aktivity použité lakázy nebylo možné vyvinout tížený lakázový biosenzor. Přesto imobilizace jiného enzymu (tyrozinázy) dala vzniknout velmi stabilním biosenzorům pro možné amperometrické stanovení neurotransmiterů.

Do budoucna se nabízí kompenzace nízké aktivity enzymu lakázy jeho vysokým množstvím v podobě průtokových reaktorů. Vysoká elektrochemická reaktivita a mechanická stabilita karbonylem-funkciovaných polymerů v režimu FIA, jsou důkazem, že tyto polymery mohou sloužit i pro vývoj katalytických biosenzorů využitelných v klinické analýze.

## Reference

- [1] STOILOVA I., KRASTANOV A., STANCHEV V. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **1**, 2010, 208-215. <https://doi:10.4236/abb.2010.13029>.
- [2] YANG J., LI W., NG T.B., DENG X., LIN J., YE X. Laccases: protection, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Frontiers in Microbiology* **8**, 2017, 832. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832>.
- [3] SHRADDHA, SHEKHER R., SEHGAL S., KAMTHANIA M., KUMAR A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research* **2011**, 2011, 217861. <https://doi.org/10.4061/2011/217861>.
- [4] FILGUEIRA D., LOSADA C.B., GOUVEIA S., MOLDES D. Laccases for wood treatment: From composites manufacturing to surfacemodification. *Laccase: Applications, Investigations and Insights* 2017, 181-206. ISBN: 978-153610582-7;978-153610556-8.
- [5] MOGHARABI M., FARAMATZI M.A. Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds. *Advanced Synthesis And Catalysis* **356**(10), 2014, 897-927. <https://doi.org/10.1002/adsc.201300960>.
- [6] RODRÍGUEZ-COUTO, S. Chapter 11 - Solid-state fermentation for laccases production and their applications. *Current developments in biotechnology and bioengineering* 2018, 211-234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00011-6>.
- [7] The Best Quality Herbs. *Trametes versicolor* může pomáhat v boji proti rakovině 2018 [online]. Převzato a upraveno z: <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/22611-epinephrine-adrenaline> [cit. 22-11-03].
- [8] KURNIAWATI S., NICELL, J.A. Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresource Technology* **99**(16), 2008, 7825-7834. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.084>.
- [9] FABBRINI M., GALLI C., GENTILI P. Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **18**(1-3), 2002, 169-171. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00082-6).
- [10] ASGHER M., IQBAL H.M.N., ASAD M.J. Kinetic characterization of purified laccase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 in solid state bio-processing of corncobs. *BioResources* **7**(1), 2012, 1171-1188. <https://doi.org/10.15376/biores.7.1.1171-1188>.

- [11] SAOUDI O., GHAOUAR N. Biocatalytic characterization of free and immobilized laccase from *Trametes versicolor* in its activation zone. *International Journal of Biological Macromolecules* **128**, 2019, 681-691.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.199>.
- [12] MATE D.M., ALCALDE M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Society for Applied Microbiology* **10**(6), 2016, 1457-1467.  
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>.
- [13] MERCK. *Laccase from Trametes versicolor* [online]. Převzato a upraveno z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/51639> [cit. 22-12-07].
- [14] UCSF HEALTH. Catecholamines-urine 2019 [online]. Převzato a upraveno z: <https://www.ucsfhealth.org/medical-tests/catecholamines---urine> [cit. 22-12-05].
- [15] Mayo clinic laboratories. Pediatric catalog 2023 [online]. Převzato a upraveno z: <https://pediatric.testcatalog.org/show/SERU> [cit. 22-12-05].
- [16] Velký lékařský slovník. Normální laboratorní hodnoty dospělých 1998-2023 [online]. <https://www.lekarske.slovniky.cz/normalni-hodnoty> [cit. 22-12-11].
- [17] BRODOWSY H.M., HENNIG A., MULLER M.T., WERNER A., ZHANDAROV S., GOHS U. Laccase-enzyme treated flax fibre for use in natural fibre epoxy composites. *Materials* **13**(20), 2020, 4529. <https://doi.org/10.3390/ma13204529>.
- [18] SUGUMARAN M., BAREK H. Critical analysis of the melanogenic pathway in insects and higher animals. *Materials* **17**(10), 2016, 1753.  
<https://doi.org/10.3390/ijms17101753>.
- [19] Ganachaud C., Lacazio V. Trimerisation of indole through laccase catalysis. *Tetrahedron Letters* **49**(15), 2008, 2476-2478. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.02.021>.
- [20] APETREI C., DASCALESCU D. Nanomaterials based electrochemical sensors for serotonin detection: a review. *Chemosensors* **9**(1), 2021, 14.  
<https://doi.org/10.3390/chemosensors9010014>.
- [21] SARADA V, RAO T, FUJISHIMA A. Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron-doped diamond electrodes. *Analytical Chemistry* **72**(7), 2000, 1632-1638. <https://doi.org/10.1021/ac9908748>.
- [22] CLEVELAND CLINIC. *Epinephrine-adrenaline* 2022 [online]. Převzato a upraveno z: <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/22611-epinephrine-adrenaline> [cit. 22-12-27].

- [23] EZIKE T.C., UDEH J., JOSHUA P., EZUGWU A., ISIWU C., V., EZE, S.O.O., CHILAKA F.C. Substrate specificity of a new laccase from *Trametes polyzona* WRF03. *Heliyon* **7**(1), 2021, e06080. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06080>.
- [24] Vědecký šnek. Rozdíl mezi hodnotami Ki, Kd, IC50 a EC50. *Vědecký šnek* 2019. Převzato a upraveno z: <https://www.lekarske.slovníky.cz/normalni-hodnoty> [cit. 22-12-12].
- [25] BRENDA. Information on EC 1.10.3.2 – laccase. *BRENDA* [online]. Dostupné z: [https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.10.3.2#kcat/KM%20VALUE%20\[1/mMs%3Csup%3E-1%3C/sup%3E\]](https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.10.3.2#kcat/KM%20VALUE%20[1/mMs%3Csup%3E-1%3C/sup%3E]) [cit. 22-12-12].
- [26] FERNANDEZ H., ARÉVALO F., GRANERO, A., ROBLEDO S., NIETO C., RIBERI W., ZON M. Electrochemical biosensors for the determination of toxic substances related to food safety developed in south America: mycotoxins and herbicides. *Chemosensors* **99**(16), 2017, 7825-7834. <https://doi.org/10.3390/chemosensors5030023>.
- [27] KURNIAWATI S., JAMES A. Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresource Technology* **782**, 2008, 7825-7834. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.084>.
- [28] SUN K., HONG D., LIU J., LI S., CHU G., QIN W., SI Y. *Trametes versicolor* laccase-assisted oxidative coupling of estrogens: Conversion kinetics, linking mechanisms, and practical applications in water purification. *Science of Total Environment* **74** (2021), 21-45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146917>.
- [29] DELGADO M., ALEMÁN-NAVA G., DELGÁDO J., ASSAD G., CHAPA S., PARRA R., BARCELO D. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2015) 21-45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>.
- [30] JOSYPČUK O., BAREK J., JOSYPČUK B. Electrochemical biosensors based on enzymatic reactor of silver solid amalgam powder for measurements in flow systems. *Electroanalysis* **60**(8), 2014, 1729-1738. <https://doi.org/10.1002/elan.201400224>.
- [31] LORENZO M., MOLDES D., COUTO S.R. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere* **60**(8), 2005, 1124-1128. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.051>.
- [32] JOHANNES C., MAJCHERCZYK A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* **78**(2), 2000, 193-199. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00208-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00208-X).

- [33] ZHOU W., ZHANG W., CAI Y. Laccase immobilization for water purification: a comprehensive review. *Chemical Engineering Journal* **403**, 2021, 126272. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126272>.
- [34] DATTA S., VEENA R., SAMUEL M.S., SELVARAJAN E. Immobilization of laccases and applications for the detection and remediation of pollutants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **19**, 2020, 521-538. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01081-y>.
- [35] MAZLAN S.Z., HANIFAH S.A. Effects of temperature and pH on immobilized laccase activity in conjugated methacrylate-acrylate microspheres. *International Journal of Polymer Science* **2017**, 2017, 5657271. <https://doi.org/10.1155/2017/5657271>.
- [36] TIGARI G., MANJUNATHA J. Electrochemical preparation of poly(arginine)-modified carbon nanotube paste electrode and its application for the determination of pyridoxine in the presence of riboflavin: an electroanalytical approach. *Journal of Analysis and Testing* **22**, 2019, 331-340. <https://doi.org/10.1007/s41664-019-00116-w>.
- [37] JYOTI, ZOLET T., MACIEJEWSKA D., GILANT E., GNIAZDOWSKA E., KUTNER A., NOWORYTA K., KUTNER W. Polytyramine film-coated single-walled carbon nanotube electrochemical chemosensor with molecularly imprinted polymer nanoparticles for duloxetine-selective determination in human plasma. *ACS Sensors* **7**, 2022, 1829-1836. <https://doi.org/10.1021/acssensors.2c00124>.
- [38] PUTHONGKHAM P., LEE S., VENTON B. Mechanism of histamine oxidation and electropolymerization at carbon electrodes. *Analytical Chemistry* **91**, 2019, 8366-8373. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01178>.
- [39] MIGNEAULT I., DARTIQUENAVE C., BERTRAND, M., WALDRON K. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* **37**(5), 2018, 790-802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>.
- [40] PERKINS S. Explainer: What are polymers? *Science News Explore* 2017 [online]. Upraveno a převzato z: <https://www.snexplores.org/article/explainer-what-are-polymers> [cit. 22-12-20].
- [41] TAKASHI F. Conductive polymers. *LibreTexts engineering* 2021 [online]. Přejzato a upraveno z: [https://eng.libretexts.org/Bookshelves/Materials\\_Science/Supplemental\\_Modules\\_\(Materials\\_Science\)/Materials\\_and\\_Devices/Conductive\\_Polymers](https://eng.libretexts.org/Bookshelves/Materials_Science/Supplemental_Modules_(Materials_Science)/Materials_and_Devices/Conductive_Polymers) [cit. 23-01-22].
- [42] GOGOI B., NILOY P., NARENDA P., NEELOTPAL N., SARMA S. Polycurcumin acrylate and polycurcumin methacrylate: Novel bio-based polymers for explosive

- chemical sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **181**, 2013, 144-152.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.01.071>.
- [43] LLEVOT A., GRAU E., CARLOTTI S., GRELIER S., CRAMAIL H. From lignin-derived aromatic compounds to novel biobased polymers. *Macromolecular Rapid Communications* **37**(1), 2015, 9-27. <https://doi.org/10.1002/marc.201500474>.
- [44] KISS L., MÁTÉ S. Electrochemical oxidation of benzaldehyde and hydroxybenzaldehydes in acetonitrile on platinum and glassy carbon electrodes. *Comptes Rendus Chimie* **22**(8), 2019, 557-561. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.06.004>.
- [45] VORYNSKA S., BAREK J., JOSYPCUK B. Influence of different covalent immobilization protocols on electroanalytical performance of laccase-based biosensors. *Bioelectrochemistry* **148**, 2022, 108223.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108223>.
- [46] TALEAT Z., KHOSHROO A., ARDAKAN M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). *Microchimica Acta* **181**, 2014, 865-891.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1>.
- [47] UPAN J., REANPANG P., CHAILAPAKUL O., JAKMUNEE J. Flow injection amperometric sensor with a carbon nanotube modified screen printed electrode for determination of hydroquinone. *Talanta* **146**, 2016, 766-771.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.026>.
- [48] McKELVIE I. Chapter 4 - Principles of flow injection analysis. *Comprehensive Analytical Chemistry* **54**, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(08\)00604-1](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(08)00604-1).
- [49] ZEN J., YANG H., CHIU M., SHIH Y. Flow injection analysis. *Journal of AOAC International* 2009 [online]. Dostupné z:  
<https://www.zensord.com/Article12.html#article-02> [cit. 23-01-22].
- [50] SOLNÁ R., SKLÁDAL P. Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds using a biosensor with immobilized laccase, peroxidase and tyrosinase. *Electroanalysis* **17**(23), 2005, 2137-2146. <https://doi.org/10.1002/elan.200403343>.
- [51] SARIKA C., REKHA K., MURTHY N.B. Studies on enhancing operational stability of a reusable laccase-based biosensor probe for detection of ortho-substituted phenolic derivátovém. *Biotech* **5** (2015), 911-924. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0292-7>.
- [52] PRŮTOKOVÁ CELA [online]. Převzato a upraveno z: [https://s7e5a.scene7.com/is/image/metrohm/CFLWCL\\_WE?\\$xh-544\\$](https://s7e5a.scene7.com/is/image/metrohm/CFLWCL_WE?$xh-544$) [cit. 23-01-23].
- [53] KUMAR K., DEVENDIRAN M., KALAIIVANI R., NARAYANAN S. Polycurcumin nanospheres modified electrode for nanoscale detection of mercury ions in seawater.

- Chemical Physics Letters* **781**, 2021, 138974.  
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2021.138974>.
- [54] NAWAZ A., SHAFI T., KHALIQ A., MUKHTAR H. Tyrosinase: sources, structure and applications. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering* **3**(5), 2017, 142-148. <https://doi.org/10.25141/2475-3432-2017-5.0135>.
- [55] SEKI M., WADA R., MUGURUMA H. Electrochemical behavior of intramolecular cyclization reaction of catecholamines at carbon nanotube/carboxymethylcellulose electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **918**, 2022, 116486.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116486>.
- [56] SUGUMARAN M. Reactivities of quinone methides versus o-quinones in catecholamine metabolism and eumelanin biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* **17**(9), 2016, 1576. <https://doi.org/10.3390/ijms17091576>.
- [57] NADY H., EL-RABIEI, M., ABD EL-HAFEZA, G.M. Electrochemical oxidation behavior of some hazardous phenolic compounds in acidic solution. *Egyptian Journal of Petroleum* **26**(3), 2017, 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.10.009>.
- [58] ENACHE T.A., OLIVEIRA-BRETT A.M. Pathways of electrochemical oxidation of indolic compounds. *Electroanalysis* **23**(6), 2011, 1337-1344.  
<https://doi.org/10.1002/elan.201000671>.
- [59] LEE J., KANG Y., CHANG J., SONG J, KIM B.K. Determination of serotonin concentration in single human platelets through single-entity electrochemistry. *ACS Sensors* **5**, 2020, 1943-1948. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00267>.
- [60] WANG J., LI P., LI Z., REN K., JIN L., ZHANG S., CHANG H., SUN Y., JI J. Electropolymerization of dopamine for surface modification of complex-shaped cardiovascular stents. *Biomaterials* **35**(27), 2014, 7679-7689.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.047>.